

**Funktionsanalyse von  
Hitzestressproteinen  
aus *Lycopersicon esculentum***

**Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften**

**vorgelegt  
beim Fachbereich Biologie und Informatik  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main**

**von  
Joanna Tripp  
aus Frankfurt am Main**

**Frankfurt im Februar 2005**

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
C	Kontrollbehandlung
CaMV	Blumenkohlmosaikvirus
cDNA	komplementäre DNA
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Cy2	Carbocyanin
Cy3	Indocarbocyanin
Dabco	1,4-Diazabicyclo-(2,2,2)-Octan
CH	Cycloheximid
DAPI	4,6-Diamindino-2-Phenylindol
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-( $\beta$ -Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
g	Erdbeschleunigung
H	Hitzestressbehandlung
Ha	<i>Helianthus annuus</i>
HA-Markierung	Haemagglutinin-Markierung
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horse raddish peroxidase</i> )
HS	Hitzestress
Hsc	<i>heat stress cognate</i>
HSE	Hitzestresselement
Hsf	Hitzestresstranskriptionsfaktor
HSG	Hitzestressgranula
Hsp	Hitzestressprotein
IR	<i>inverted repeat</i>
Le	<i>Lycopersicon esculentum</i>

Lp	<i>Lycopersicon peruvianum</i>
MES	Morpholinethansulfonsäure
miRNA	micro RNA
M <sub>r</sub>	relatives Molekulargewicht
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonucleinsäure
MS-Medium	Murashige-Skoog-Medium
MtSB	Mikrotubuli-stabilisierender Puffer
NES	Kernexportsequenz ( <i>nuclear export signal</i> )
NLS	Kernimportsequenz ( <i>nuclear localisation signal</i> )
N-Terminus	Amino-Terminus
ORF	offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
P	Präinduktion
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	Polyethylenglycol
Pfu-Polymerase	<i>proof-reading</i> -Polymerase
PIPES	Piperazin-N,N-bis-(2-Ethansulfonsäure)
Ps	<i>Pisum sativum</i>
RNAi	<i>RNA-interference</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sHsp	<i>small</i> Hsp
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> -Polymerase
Tris	Tris-(Hydroxyl)-Methylamin
UTR	nicht-translatierte Region ( <i>untranslated region</i> )
Vol.	Volumen

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1</b>	<b>Die Hitzestressantwort .....</b>	<b>6</b>
<b>1.2</b>	<b>Die Expression von Hsp wird durch Hitzestresstranskriptionsfaktoren (Hsf) reguliert .....</b>	<b>7</b>
<b>1.3</b>	<b>Die Hsp 20-Familie .....</b>	<b>9</b>
1.3.1	sHsp werden sowohl stress- als auch entwicklungsabhängig exprimiert .....	11
1.3.2	Oligomerisierung und Chaperonfunktion .....	12
1.3.3	sHsp als Teil eines Chaperonnetzwerkes .....	16
1.3.4	Pflanzliche sHsp bilden unter Hitzestress hochmolekulare Aggregate .....	16
<b>1.4</b>	<b>Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit .....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Allgemeine Methoden .....</b>	<b>19</b>
<b>2.2</b>	<b>Reverse Transkription und PCR .....</b>	<b>19</b>
<b>2.3</b>	<b>Herstellung pflanzlicher Expressionsvektoren .....</b>	<b>19</b>
<b>2.4</b>	<b>Aufarbeitung und Transformation von Tomatenprotoplasten .....</b>	<b>20</b>
<b>2.5</b>	<b>Indirekte Immunfluoreszenz und Elektronenmikroskopie .....</b>	<b>20</b>
<b>2.6</b>	<b>Messung der Luciferaseaktivität .....</b>	<b>21</b>
<b>2.7</b>	<b>Herstellung von Proteinextrakten und Immunoblot-Analyse .....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>Thermotoleranz von CS-Protoplasten .....</b>	<b>24</b>
3.1.1	Protektion von Luciferase in CS-Protoplasten .....	24
3.1.2	Die Bildung von Hitzestressgranula korreliert mit dem Schutz der Luciferase .....	27
<b>3.2</b>	<b>Wiederherstellung von Thermotoleranz durch transiente Expression von Hsf .....</b>	<b>30</b>

<b>3.3</b>	<b>Funktion von sHsp, Hsp70 und Hsp101 in der Ausprägung von Thermotoleranz .....</b>	<b>42</b>
3.3.1	Analyse der Funktion einzelner Komponenten des Chaperonnetzwerkes mittels RNAi.....	42
3.3.2	Wiederherstellung von Thermotoleranz durch transiente Expression von Chaperonen: ein synthetischer Ansatz.....	49
<b>3.4</b>	<b>Interaktionen cytoplasmatischer sHsp .....</b>	<b>52</b>
3.4.1	Interaktionen cytoplasmatischer sHsp der Klassen CI, CII und CIII.....	52
3.4.2	Oligomerisierungsverhalten von Klasse CI-sHsp der Tomate und Bildung von Mischkomplexen mit sHsp der Klasse CII .....	55
<b>3.5</b>	<b>Intrazelluläre Verteilung und Aggregationsverhalten von HsfA2 .....</b>	<b>60</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>63</b>
<b>4.1</b>	<b>Ausprägung von Thermotoleranz.....</b>	<b>63</b>
<b>4.2</b>	<b><i>RNA-interference</i> erlaubt den spezifischen <i>knock-down</i> der Expression einzelner Komponenten des Chaperonsystems .....</b>	<b>64</b>
<b>4.3</b>	<b>Vertreter der Hsp70-Familie schützen Proteine vor der Denaturierung und spielen eine Rolle bei ihrer Rückfaltung.....</b>	<b>66</b>
<b>4.4</b>	<b>Hsp101 ist für die Rückfaltung denaturierter Proteine von Bedeutung.....</b>	<b>68</b>
<b>4.5</b>	<b>sHsp der Klasse CI, nicht aber der Klasse CII sind an der Protektion der Luciferase beteiligt .....</b>	<b>69</b>
<b>4.6</b>	<b>Oligomerisierung und Chaperonfunktion von sHsp.....</b>	<b>73</b>
<b>4.7</b>	<b>Bildung von HSG-Komplexen und Interaktion cytoplasmatischer sHsp.....</b>	<b>75</b>
<b>4.8</b>	<b>Die Aktivität von HsfA2 wird von einem sHsp der Klasse CII reguliert.....</b>	<b>76</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>81</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>97</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Hitzestressantwort

Alle Organismen, ob Bakterien, Tiere oder Pflanzen, reagieren auf Hitzeeinwirkung mit der Synthese einer bestimmten Gruppe von Proteinen, den sogenannten Hitzestressproteinen (Hsp). Bei der Hitzestressantwort handelt es sich um einen allgemeinen Mechanismus, der in allen lebenden Organismen vorkommt, und zwar in einem für jeden Organismus typischen Temperaturbereich. Auch andere Arten von Stress können die Hitzestressantwort auslösen, etwa chemische Stressoren wie Gifte der Atmungskette, Schwermetalle, Aminosäureanaloga, Antibiotika und Ethanol oder Verwundung von Geweben und Krebs. Einige Vertreter der Hsp werden nicht nur unter Stressbedingungen, sondern auch konstitutiv bzw. in bestimmten Entwicklungsstadien eines Organismus exprimiert (Übersicht in Nover, 1991). Als „molekulare Chaperone“ sind Hsp an Proteinfaltung und -topogenese beteiligt. Der Begriff „molekulare Chaperone“ beschreibt eine Klasse zellulärer Proteine, die inkorrekte Proteininteraktion und -aggregation verhindern können und die korrekte Faltung von Proteinen ermöglichen, aber selbst keine sterische Information für ihr Substrat enthalten. Inkorrekte Proteininteraktion und -aggregation kann sowohl bei der Neusynthese von Proteinen, als auch infolge von Stress auftreten. Sie ist die Folge der Interaktion hydrophober Regionen, die exponiert an der Oberfläche partiell entfalteter Proteine vorliegen. Chaperone sind in der Lage, diese exponierten hydrophoben Regionen abzuschirmen. Einige Chaperone verfügen über die Fähigkeit, Proteinaggregate aufzulösen. (Übersicht in Hartl und Hayer-Hartl, 2002). Chaperone werden entsprechend ihres Molekulargewichtes in Familien eingeteilt. Die wichtigsten sind in Tab. 1 zusammengestellt. Da Proteine der Hsp20-Familie im Zentrum meiner Arbeit stehen, werde ich auf diese in den folgenden Abschnitten noch näher eingehen.

**Tab. 1: Übersicht über die wichtigsten Chaperonfamilien.**

Chaperonfamilie	Cochaperone	Strukturelle Eigenschaften	Funktion
Hsp100 (ClpA, ClpP, ClpX)	-	Hexa- oder heptamerer Ring	Auflösung von Proteinaggregaten, Proteolyse
Hsp90 (HtpG)	-	Dimer	Interaktion mit regulatorischen Proteinkomplexen; agiert zusammen mit anderen Chaperonsystemen wie Hsp70/Hsp40
Hsp70 (DnaK)	Hsp 40 (DnaJ), BAG-1 (GrpE), Hip, Hop	Monomer	Co- und posttranslationale Proteinfaltung in einem ATP-abhängigen Zyklus
Hsp60 (GroEL)	Hsp 10 (GroES)	Zwei heptamere Ringe bilden ein fassförmiges Kompartiment	Posttranslationale Proteinfaltung, die in einem ATP-abhängigen Zyklus in einer abgeschlossenen Umgebung stattfindet; GroES dient als Verschluss des GroEL-Ringes
Hsp20 (IbpA, IbpB)	-	Sphärische oder ringförmige Komplexe mit verschiedener Anzahl von Untereinheiten	ATP-unabhängige Verhinderung irreversibler Proteinaggregation

Die Bezeichnungen der entsprechenden Vertreter in *Escherichia coli* sind in Klammern gesetzt. Übersicht in Forreiter und Nover (1998); Walter und Buchner (2002); Hartl und Hayer-Hartl (2002).

## **1.2 Die Expression von Hsp wird durch Hitzestresstranskriptionsfaktoren (Hsf) reguliert**

Die stressinduzierte Hsp-Synthese wird auf Transkriptionsebene reguliert. Hitzestress ist der Auslöser für die Aktivierung von sogenannten Hitzestresstranskriptionsfaktoren (Hsf). Diese gehen aus einer Hsp-gebundenen, inaktiven und monomeren in eine aktive, trimere Form über, gefolgt von Kernimport und Bindung an die DNA. Die Bindungsstelle der Hsf ist dabei in der Promotorregion der Hsp-kodierenden Gene lokalisiert und beinhaltet die für alle eukaryotischen Hitzestresspromotoren charakteristische Sequenz –AGAAnnTTCT– (Übersicht in Nover und Scharf, 1997, Nover et al., 2001, Baniwal et al., 2004). Das pflanzliche Hsf-System ist weitaus komplexer als das anderer Organismen: Während in *Arabidopsis thaliana* 21 und in

Tomate 17 Hsf identifiziert werden konnten, findet man nur 4 Hsf in Vertebraten und jeweils einen Hsf in *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Caenorhabditis elegans*. Hsf zeichnen sich durch eine modulare Struktur aus. Sie verfügen über eine hochkonservierte DNA-Bindedomäne (DBD), die ein zentrales *helix-turn-helix*-Motiv beinhaltet, sowie eine Oligomerisierungsdomäne (HR-A/B-Region), die durch ein Muster von *heptad hydrophobic repeats* gekennzeichnet ist. Die C-terminale Aktivierungsdomäne (CTAD) ist die am wenigsten konservierte Domäne der Hsf und beinhaltet kurze Peptidmotive, die reich an aromatischen (W, F, Y), großen hydrophoben (L, I, V) und sauren (E, D) Aminosäureresten sind (Döring et al., 2000; Kotak et al., 2004). Entscheidend für die intrazelluläre Lokalisation ist das Vorhandensein eines Kernlokalisierungssignals (NLS, *nuclear localisation signal*), welches aus einer Anhäufung basischer Aminosäurereste besteht (Lyck et al., 1997). Die Verteilung zwischen Zellkern und Cytoplasma kann weiterhin durch Kernexport beeinflusst werden, wofür ein Leucin-reiches Kernexportsignal (NES, *nuclear export signal*) verantwortlich ist (Heerklotz et al., 2001). Pflanzliche Hsf können anhand von Besonderheiten vor allem in der HR-A/B-Region in drei Klassen unterteilt werden. Die Klassen A und C verfügen aufgrund einer Insertion von 21 (Klasse A) bzw. 7 Aminosäureresten (Klasse C) im Gegensatz zur Klasse B über eine verlängerte HR-A/B-Region. Die Klasse C weist sowohl in der DBD als auch in der HR-A/B-Region klare Unterschiede zu Mitgliedern der beiden anderen Klassen auf (Nover et al., 2001).

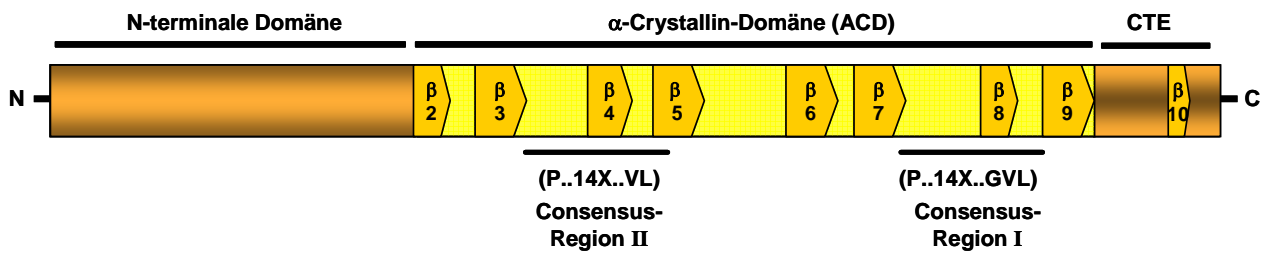
Bereits die nähere Charakterisierung von vier Hsf aus der Tomate zeigte, dass jedem dieser Proteine eine spezifische Funktion zukommt. Der konstitutiv exprimierte HsfA1 spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der Hitzestressantwort. Eine durch RNAi (*RNA-interference*) stark verminderte Expression von HsfA1 führte nicht nur zu einer reduzierten Synthese von Hsp, sondern auch von hitzestressinduzierten Hsf, wie beispielsweise HsfA2 oder HsfB1 (Mishra et al., 2002). HsfA2 ist wie HsfA1 ein starker Aktivator der Transkription. Er liegt in der Zelle in drei verschiedenen Formen vor: (1) Aufgrund einer starken C-terminalen NES ist HsfA2 nur in Gegenwart von HsfA1 im Kern lokalisiert, vermutlich in Form eines Heterooligomers (Scharf et al., 1998; Heerklotz et al., 2001). (2) Während eines länger andauernden Hitzestresses wird HsfA2 in cytoplasmatische Chaperonkomplexe, die Hitzestressgranula (HSG) eingebaut und befindet sich somit in einem unlöslichen Zustand. (3) In der Erholungsphase nach dem Hitzestress wird HsfA2 aus den HSG freigesetzt und ist in löslicher Form im Cytoplasma zu finden. HsfA3 wird in der Zellkultur konstitutiv exprimiert, ist aber in



Tomatenblättern kaum nachweisbar, wird also möglicherweise nur in sich schnell teilenden Zellen exprimiert (Bharti et al., 2000). HsfB1 verfügt im Unterschied zu den Hsf der Klasse A über keine Aktivität als Aktivator der Transkription, kooperiert aber als Koaktivator mit Hsf der Klasse A, wie HsfA1. Nach Bindung eines Promotors adäquaten Aufbaus kommt es zur Bildung eines Enhanceosom-artigen Komplexes, was zu einer synergistischen Aktivierung des betreffenden Promotors führt. HsfB1 interagiert in ähnlicher Weise mit anderen Aktivatoren, z.B. dem ASF1/2 *enhancer binding protein* des 35S-Promotors des Blumenkohlmosaikvirus, oder mit noch nicht identifizierten Aktivatoren, die die Expression von Haushaltsgenen kontrollieren. Weiterhin rekrutiert HsfB1 das pflanzliche Homolog des CREB-Bindeproteins (CBP), HAC1. Infolgedessen wird die Affinität der DNA-Bindung und die Aktivität der Transkription erhöht (Bharti et al., 2004).

### 1.3 Die Hsp 20-Familie

Die Mitglieder der Hsp 20-Familie, auch als lmw (*low molecular weight*) Hsp oder sHsp (*small* Hsp) bezeichnet, verfügen über Molekulargewichte zwischen 12 und 42 kDa. Sequenzhomologien beschränken sich auf etwa 90 Aminosäurereste im C-Terminus, die so genannte  $\alpha$ -Crystallin-Domäne (ACD). Diese ist nach dem Protein  $\alpha$ -Crystallin aus der Augenlinse von Vertebraten benannt und kann wiederum in die Consensus-Regionen I und II unterteilt werden, die durch eine hydrophile Domäne variabler Länge getrennt werden (Abb. 1).

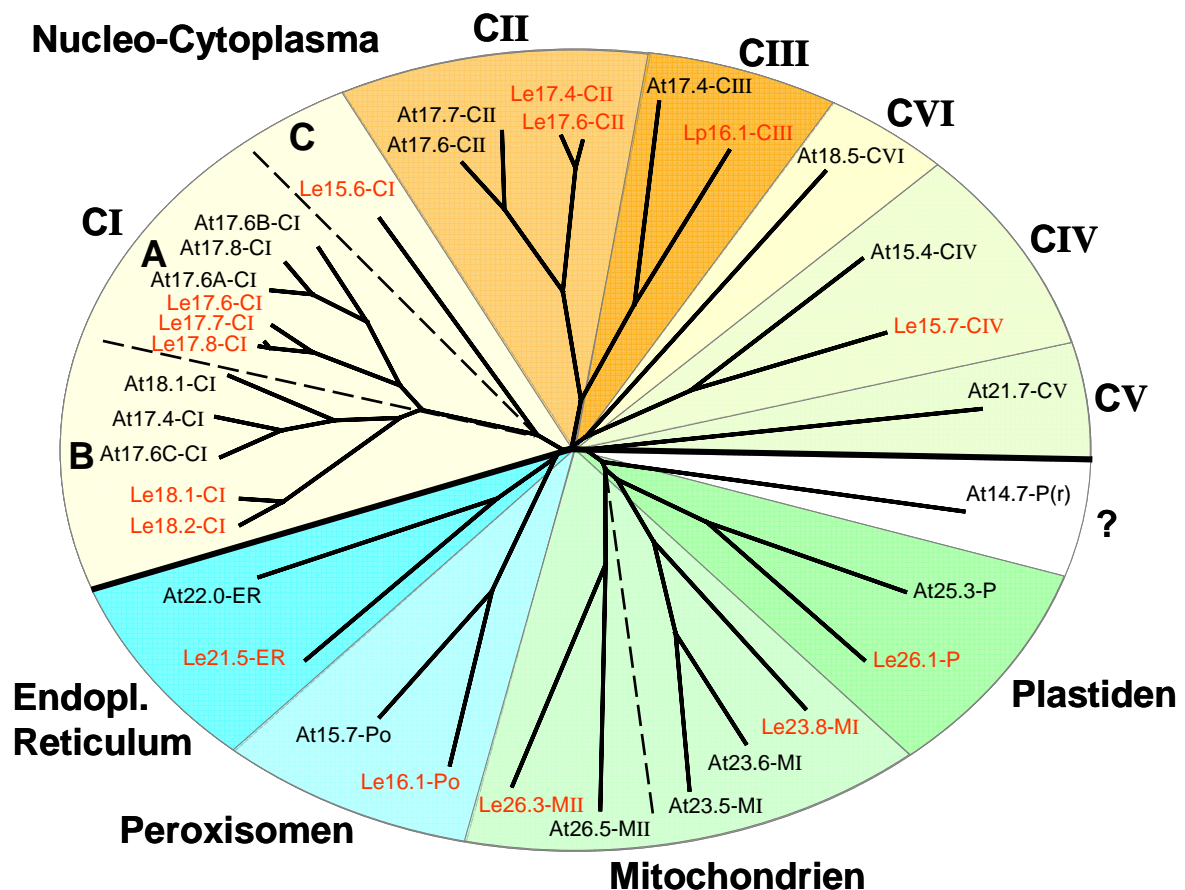


**Abb. 1: Grundstruktur der sHsp.**

Charakteristisch für alle sHsp ist die 90 Aminosäurereste lange, konservierte α-Crystallin-Domäne (ACD). Sowohl Bereiche in der C-terminalen Verlängerung der ACD (CTE, *C-terminal extension*) als auch der N-Terminus weisen im Gegensatz dazu eine relativ hohe Sequenzflexibilität auf. Innerhalb der ACD befinden sich zwei hochkonservierte Sequenzmotive, die Consensus-Regionen I und II. In der ACD sind 8 β-Stränge zu finden (β2-9), die CTE beinhaltet einen weiteren β-Strang (β10). Die Nummerierung der β-Stränge orientiert sich an der Kristallstruktur von *Methanococcus jannaschii* Hsp16.5, welches über 10 β-Stränge verfügt (Kim et al., 1998).

Während nur 2 Vertreter der sHsp in Hefe bekannt sind und 10 in Säugetieren, existieren 19 Vertreter in *Arabidopsis thaliana* (Scharf et al., 2001; Fontaine et al. 2003; Haslbeck et al., 2004). Die Anwesenheit von im Allgemeinen 1-2 sHsp-Genen in Archaea deutet auf einen frühen phylogenetischen Ursprung dieser Proteinfamilie hin. Unter den Bakterien sind in einigen Arten mehr als 10 Gene zu finden. In anderen, meist parasitisch lebenden Arten fehlen sie völlig (Übersicht in Narberhaus et al., 2002).

Die in Pflanzen synthetisierten sHsp werden anhand ihrer intrazellulären Lokalisation in Klassen unterteilt (Abb. 2): sHsp der Klasse CI, Klasse CII und Klasse CIII befinden sich im Cytosol, sHsp der Klasse P in den Plastiden, der Klasse ER im Endoplasmatischen Reticulum und im Golgi-Apparat, der Klasse M in den Mitochondrien (Scharf et al., 2001). Neben den „klassischen“ cytoplasmatischen Vertretern existieren eine Reihe weiterer cytoplasmatisch lokalisierter Proteine, die über eine ACD verfügen. Diese können in die Klassen CIV, CV und CVI eingeordnet werden. Aufgrund großer Sequenzunterschiede werden auch die mitochondrialen sHsp in zwei Klassen, MI und MII unterteilt. sHsp kommen auch in den Peroxisomen vor, sie werden der Klasse Po zugeordnet (M. Siddique, persönliche Mitteilung).



**Abb. 2: Klassifizierung pflanzlicher sHsp.**

Die Abbildung wurde unter Verwendung von ClustalX erstellt, wobei die gesamte Aminosäuresequenz der dargestellten Proteine berücksichtigt wurde. Die Proteine der cytoplasmatischen Klassen CIV, CV und CVI sind klar von den Proteinen anderer cytoplasmatischer Klassen abgegrenzt und wurden daher in eigene Klassen eingeordnet. Die Vertreter der Klasse CI können in die Gruppen A, B und C unterteilt werden. At14.7-P(r) konnte keiner Klasse eindeutig zugeordnet werden. At *Arabidopsis thaliana* (schwarz); Le *Lycopersicon esculentum* (rot)

### 1.3.1 sHsp werden sowohl stress- als auch entwicklungsabhängig exprimiert

sHsp kommen im Allgemeinen in vegetativen Geweben nur unter Stressbedingungen vor. Dann allerdings kann der Anteil dieser Proteine bis zu 1 % am Gesamtproteingehalt einer Zelle betragen, wie für ein Klasse CI-Protein aus Erbse gezeigt werden konnte. Dieses Protein erwies sich weiterhin mit einer Halbwertszeit von 38 h als sehr stabil in der Erholungsphase nach der Hitzestressperiode (DeRocher et al., 1991).

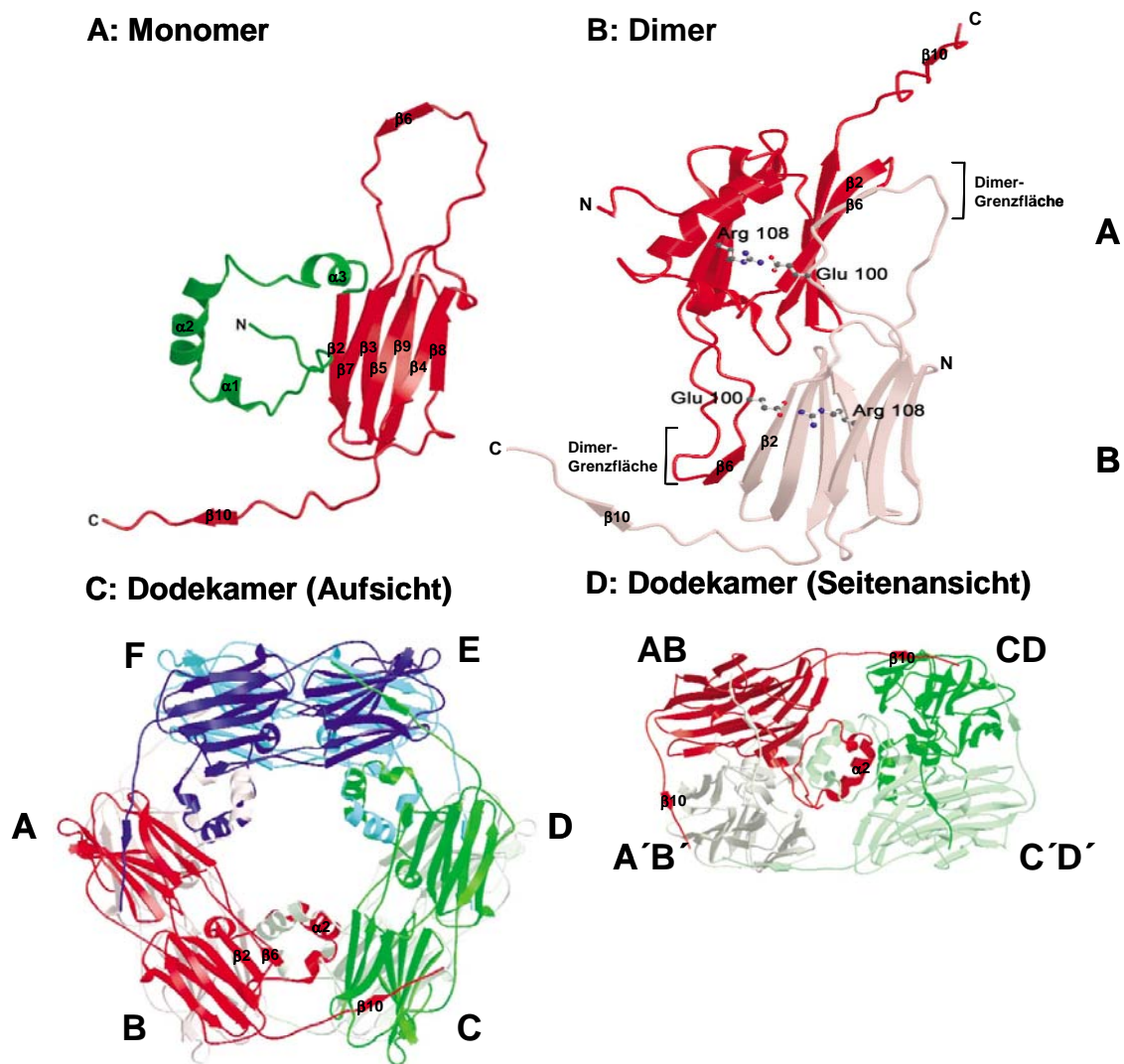
sHsp werden allerdings nicht nur unter dem Einfluss abiotischer Stressoren exprimiert. Ihre Synthese konnte während verschiedener Stadien der pflanzlichen Entwicklung nachgewiesen werden, wie z.B. der Embryogenese, der Samenkeimung, der

Pollenentwicklung und der Fruchtreifung. Die entwicklungsabhängige Expression von sHsp in der Samenentwicklung und -keimung wurde in verschiedenen Arten detailliert untersucht (Coca et al., 1994; Wehmeyer et al.; 1996, Rojas et al.; 1999, Wehmeyer und Vierling, 2000). In diesem Zusammenhang sind sHsp wohl daran beteiligt, zelluläre Komponenten während der Austrocknung des Samens bzw. während seiner Rehydrierung zu schützen. Die entwicklungsabhängige Expression von sHsp scheint nicht allein von Hsf abzuhängen: Transiente Expression von ABI3, einem Transkriptionsfaktor aus *Arabidopsis thaliana* bewirkt in Sonnenblumenembryos die Aktivierung des Ha (*Helianthus annuus*) hsp17.7 G4-Promotors. Coexpression von ABI3 und Tomaten-HsfA1 führt zu einer synergistischen Aktivierung dieses Promotors (Rojas et al., 1999). In Samen der *Arabidopsis thaliana*-Mutante *abi3-6* fehlen sHsp völlig (Wehmeyer et al., 1996). Die Beobachtung, dass auch in den Mutanten *fus3-3* und *lec1-2* die Expression von sHsp in Samen stark reduziert ist, lässt vermuten, dass auch andere an Samenentwicklung und Austrocknungstoleranz beteiligte Transkriptionsfaktoren bei der entwicklungsabhängigen Expression von sHsp eine Rolle spielen (Wehmeyer und Vierling, 2000).

### 1.3.2 Oligomerisierung und Chaperonfunktion

sHsp bilden Oligomere eines Molekulargewichtes zwischen 200 und 800 kDa, die aus einer von Organismus zu Organismus unterschiedlichen Anzahl von Monomeren zusammengesetzt sind.

Die Aufklärung der Röntgenkristallstruktur zweier sHsp gab detaillierten Aufschluss über den Aufbau der Oligomere (Kim et al., 1998; van Montfort et al., 2001). So bildet Hsp16.5 aus dem Archaeobakterium *Methanococcus jannaschii* Homooligomere aus 24 Untereinheiten, die eine Hohlkugel bilden. Die hochkonservierte, hydrophobe Aminosäurereste enthaltende  $\alpha$ -Crystallin-Domäne ist an der Interaktion der Untereinheiten beteiligt. Die Daten legen nahe, dass Dimere die Grundbausteine der Hohlkugel darstellen. Dabei wird an der Grenzfläche zweier Untereinheiten aus zwei  $\beta$ -Strängen, die diesen beiden Untereinheiten entstammen, gemeinsam ein  $\beta$ -Faltblatt gebildet (Kim et al., 1998). Im Unterschied zu Hsp16.5 handelt es sich bei Hsp16.9A-CI (früher: Hsp16.9) aus Weizen um ein Dodekamer, dass aus zwei Scheiben besteht, die aus jeweils 6 Untereinheiten zusammengesetzt sind (siehe auch Abb. 3).



**Abb. 3: Aufbau des Hsp16.9-Dodekamers aus Weizen.**

(A) Ein Monomer besteht aus einem N-terminalen Arm (grün), der ungeordnet oder, wie in (A) dargestellt, geordnet vorliegen kann, der  $\alpha$ -Crystallin-Domäne, die aus zwei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern besteht, sowie der C-terminalen Verlängerung (beide rot). Den  $\beta$ -Faltblättern entspringt eine Schleife, die den  $\beta$ -Strang ( $\beta 6$ ) enthält, der für den stärksten Kontakt mit einem benachbarten Monomer verantwortlich ist (Dimer-Grenzfläche). (B) Die Grundeinheit des Dodekamers ist ein asymmetrisches Dimer. Es besteht aus zwei Monomeren mit jeweils einem geordneten und einem ungeordneten N-terminalen Arm. Die beiden Monomere interagieren über Bildung eines  $\beta$ -Faltblattes aus den  $\beta$ -Strängen  $\beta 2$  und  $\beta 6$ . (C) Die 12 Untereinheiten des Hsp16.9-Dodekamers sind in Form zweier Scheiben angeordnet, die ein Loch in der Mitte aufweisen. Die Grenzfläche zweier Dimere befindet sich zwischen roten und pinkfarbenen, blauen und türkisfarbenen sowie grünen und grauen Dimeren. (D) Die Seitenansicht zeigt zwei der drei Tetramere, die das Dodekamer bilden. Die beiden C-terminalen Verlängerungen eines Dimers ( $\beta 10$ ) zeigen eine unterschiedliche Orientierung und binden sowohl das benachbarte Dimer aus derselben Scheibe als auch das der benachbarten Scheibe. Die N-terminalen Arme der Monomere der oberen Scheibe bilden gemeinsame helikale Domänen ( $\alpha 2$ ) mit N-terminalen Armen von Monomeren der unteren Scheibe (verändert nach van Montfort et al., 2001).

Auch bei Hsp16.9A-CI stellen Dimere die Grundbausteine des Oligomers dar. Für die Assemblierung beider Oligomere spielt die C-terminale Verlängerung der jeweiligen Untereinheiten eine wichtige Rolle (van Montfort et al., 2001).

Eine Bildung von Mischoligomeren konnte an verschiedenen sHsp aus Säugetieren gezeigt werden. So sind native  $\alpha$ -Crystallin-Komplexe, die aus der Augenlinse isoliert wurden, aus  $\alpha$ A- und  $\alpha$ B-Crystallin-Untereinheiten in einer Stöchiometrie von 3:1 zusammengesetzt (Horwitz et al., 1999). Sowohl  $\alpha$ A- als auch  $\alpha$ B-Crystallin können Heterooligomere mit Hsp25 bilden.  $\alpha$ A-Crystallin-Komplexe tauschen Untereinheiten mit Hsp27-Komplexen aus (Merck et al., 1993; Bova et al., 2000). In Pflanzen ist nur die Bildung von Heterooligomeren aus Vertretern einer Klasse beschrieben: Isolierte native Klasse CI-Oligomere aus Sojabohne, Reis, Mungbohne und Erbse bestehen aus mehreren Isoformen (Jinn et al., 1995). Auch die dodekameren Komplexe von Hsp18.1-CI aus Erbse und Hsp16.9-CI aus Weizen sind in der Lage, *in vitro* Untereinheiten auszutauschen (Sobott et al., 2002).

sHsp verfügen über ATP-unabhängige Chaperonaktivität, wie unter Verwendung von Reporterproteinen wie Luciferase, Citratsynthase, Malat-Dehydrogenase und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden konnte (Lee et al., 1995; Lee et al., 1997; Forreiter et al., 1997; Ehrnsperger et al., 1999; Löw et al., 2000). Luciferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* eignet sich aufgrund ihrer Thermosensitivität gut zur Darstellung von Chaperoneffekten. Die Thermosensitivität ist auf die besonderen strukturellen Eigenschaften des Proteins zurückzuführen. Luciferase besteht aus einer großen, N-terminalen Domäne und einer kleineren, C-terminalen Domäne, die durch eine Spalte getrennt sind. Das Verbindungsstück zwischen den beiden Domänen ist wahrscheinlich flexibel. Da das aktive Zentrum unter Beteiligung von Aminosäureresten entsteht, die in beiden Proteindomänen zu finden sind, ist das Protein bereits im teilweise entfalteten Zustand inaktiv (Conti et al., 1996).

Über natürliche Substrate der sHsp ist wenig bekannt. Detaillierte Untersuchungen liegen für Hsp16.6 aus *Synechocystis* vor. Dieses Protein ist in der Lage, Proteine zu schützen, die eine Rolle in der Transkription, Translation, Signaltransduktion und im Sekundärstoffwechsel spielen (Basha et al., 2003). Auch Hsp26 und Hsp42 aus Hefe

verhindern unter Hitzestress die Aggregation von Proteinen aus vielen verschiedenen Stoffwechselwegen, wobei ihr Substratspektrum zu 90 % identisch ist (Haslbeck et al., 2004). Zur Lokalisierung der Substratbindestellen innerhalb der sHsp werden häufig kleine aromatische Moleküle wie ANS (1-Anilino-8-Naphtalensulfonat) oder bis-ANS (1,1'-bi(4-Anilino)-Naphtalen-5,5'-Disulfonsäure) verwendet, die an exponierte hydrophobe Oberflächen binden. Für Hsp18.1-CI aus Erbse konnte so nachgewiesen werden, dass die Consensus-Region II in der  $\alpha$ -Crystallin-Domäne mit ihren hydrophoben Aminosäureresten, sowie Bereiche aus der N-terminalen Domäne an der Substratbindung beteiligt sind (Lee et al., 1997).

Die Fähigkeit zur Assemblierung und Dissoziation der oligomeren Strukturen der sHsp ist eng mit ihrer Chaperonaktivität verknüpft. Es gibt einige Hinweise, dass sHsp-Oligomere eine inaktive, aber dynamische Speicherform darstellen. Die Interaktion mit dem Substrat erfordert eine Dissoziation der Oligomere und eine Reassemblierung. Im Falle von Hsp26 und Hsp16.9A-CI führt eine Temperaturerhöhung zur Dissoziation der Oligomere in Dimere (Haslbeck et al., 1999; van Montfort et al., 2001). Diese Dimere können mit denaturierenden Proteinen interagieren, wie am Beispiel von Hsp26 gezeigt werden konnte, und bilden schließlich große sHsp-Substrat-Komplexe (Haslbeck et al., 1999). Für Hsp25 aus Maus dagegen scheint eine temperaturabhängige Dissoziation keine Rolle zu spielen. Hsp25 liegt als Hexadekamer vor, das sich aus Tetrameren zusammensetzt, und mit dieser tetrameren und einer dimeren Form in einem konzentrationsabhängigen Gleichgewicht steht. Unter Hitzeeinwirkung bildet Hsp25 *in vitro* 1,3 MDa große Partikel, die ebenso wie die hexadekamere und die tetramere Form Chaperonaktivität aufweisen und *in vitro* die Aggregation von Citratsynthase unter Hitzestress unterdrücken (Ehrnsperger et al., 1999). Ein Einfluss des Phosphorylierungszustandes auf die Oligomerisierung und Chaperonfunktion der sHsp konnte an Hsp27 und  $\alpha$ B-Crystallin aus Säugern gezeigt werden: Die Größe der Oligomere phosphorylierter Proteine war stark reduziert. Die Phosphorylierung geht weiterhin mit einer reduzierten Chaperonaktivität einher (Rogalla et al., 1999; Ito et al., 2001). In Pflanzen ist bisher nur ein Beispiel für Phosphorylierung eines sHsp bekannt: Es handelt sich dabei um das mitochondriale Hsp22 aus Mais. Die Funktion der Phosphorylierung wurde allerdings nicht untersucht (Lund et al., 2001).

### 1.3.3 sHsp als Teil eines Chaperonnetzwerkes

Wie im vorherigen Abschnitt dargestellt, sind sHsp in der Lage, selektiv denaturierende Proteine zu binden, ihre Aggregation zu verhindern und eine Konformation aufrechtzuerhalten, die eine spätere Renaturierung ermöglicht. Sie verfügen aber nicht selbst über die Fähigkeit, diese Renaturierung zu bewirken. Dies wird nach aktuellen Modellen in einem ATP-abhängigen Mechanismus von Mitgliedern anderer Chaperonfamilien vorgenommen. In diesem Zusammenhang sind vor allem Hsp70 und Hsp100 von Bedeutung (Forreiter et al., 1997; Ehrnsperger et al., 1997; Lee und Vierling, 2000; Mogk et al., 2003). Hsp25 beispielsweise erhält Citratsynthase in einem renaturierbaren Zustand. Für eine Freisetzung und die Rückfaltung in die aktive Form ist allerdings die Gegenwart von Hsp70 nötig (Ehrnsperger et al., 1997). Auch am Beispiel von Hsp18.1-CI aus Erbse konnte das Zusammenwirken mit der Hsp70/Hsp40-Maschinerie demonstriert werden. Hsp18.1-CI verhindert *in vitro* unter Hitzeeinwirkung die Aggregation von Luciferase, und ermöglicht eine verbesserte Renaturierung in Gegenwart von Hsc70 und dessen Cochaperonen (Lee und Vierling, 2000).

Die kooperative Wirkung des Hsp70/Hsp40 (DnaK/DnaJ)-Systems zusammen mit Proteinen der Hsp100 (Clp)-Familie ermöglicht die Auflösung unlöslicher Aggregate (Mogk et al., 1999; Zolkiewski et al., 1999). Dabei scheint das Hsp70/Hsp40 (DnaK/DnaJ)-System mehr an der Dissoziation löslicher sHsp-Substrat-Komplexe beteiligt zu sein, während die Hsp70/Hsp40 (DnaK/DnaJ)/ Hsp100 (Clp)-vermittelte Rückfaltung die Resolubilisierung großer, unlöslicher Proteinaggregate mit assoziierten sHsps erlaubt (Mogk et al., 2003).

### 1.3.4 Pflanzliche sHsp bilden unter Hitzestress hochmolekulare Aggregate

Eine Eigenschaft der cytoplasmatischen sHsp in Pflanzen ist es, unter länger andauerndem Hitzestress große, cytoplasmatische Aggregate, die sogenannten Hitzestressgranula (HSG) zu bilden. In Tomatenzellkultur konnte gezeigt werden, dass die Expression von sHsp durch eine kurze Hitzestressperiode induziert wird, und die sHsp zunächst löslich im Cytoplasma verteilt in Form 10 nm großer Partikel (Prä-HSG) vorliegen. Unter andauerndem Hitzestress gehen aus den Prä-HSG die 30-40 nm großen HSG hervor. Diese Aggregate enthalten neben sHsp auch Hsp70, HsfA2, Ribonucleoproteinpartikel und Cytoskelettelemente (Nover et al., 1983, 1989; Scharf et al., 1998). Die Aggregation ist ein reversibler Prozess: In der auf den Hitzestress



folgenden Erholungsphase sind die sHsp wieder in Form der Prä-HSG zu finden. Die Tatsache, dass in HSG-Fraktionen mRNA enthalten ist, führte zu der Hypothese, dass die HSG als Speicher und zum Schutz von Haushalts-mRNA während einer Hitzestressperiode dienen (Nover et al., 1983, 1989). Diese Hypothese fand Unterstützung durch den Befund, dass in Stressgranula, die in Säugetierzellen nachgewiesen werden konnten, RNA-Bindeproteine und mRNA enthalten sind. sHsp sind in diesen Stressgranula allerdings nur enthalten, wenn die Stressantwort durch Hitze ausgelöst wurde, nicht aber nach Einwirkung anderer Stressoren (Übersicht in Kedersha und Anderson, 2002).

#### **1.4 Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Funktion einzelner Komponenten des pflanzlichen Chaperonsystems und ihr Zusammenspiel im komplexen Netzwerk der Hitzestressantwort zu untersuchen. Als Modellsystem dienten Protoplasten transgener Tomatenpflanzen (*Lycopersicon esculentum* cv. „Moneymaker“). Diese transgenen Tomatenpflanzen weisen eine Integration dreier Transgenkassetten auf, die für den Hitzestresstranskriptionsfaktor HsfA1 kodieren (HsfA1-Cosuppressions (CS)-Pflanzen). Zwei dieser Transgenkassetten sind als *tandem inverted repeat* angeordnet. Infolgedessen kommt es zu einem Cosuppressionseffekt, der zu einer stark verminderten Expression von HsfA1 führt. Das Fehlen dieses Hitzestresstranskriptionsfaktors führt zu einer stark verminderten Expression von endogenen Hsp sowie hitzestressinduzierter Hsf.

Im Rahmen der experimentellen Arbeiten wurden folgende Teilaspekte untersucht:

##### **(1) Thermotoleranz in CS-Protoplasten**

Zur Darstellung der Thermotoleranz von Wildtyp (WT)- und HsfA1-Cosuppressions (CS)-Protoplasten wurde die thermische Inaktivierung von *Photinus pyralis*-Luciferase nach einem Hitzestress und ihre Reaktivierung in der darauf folgenden Erholungsphase untersucht. Weiterhin wurde untersucht, ob es zur Expression endogener Hsp sowie zur Bildung von HSG-Komplexen kommt.

**(2) Wiederherstellung der Thermotoleranz durch transiente Expression von Hsf**

Weiterhin stellte sich die Frage, ob die fehlende Thermotoleranz von CS-Protoplasten durch Überexpression von HsfA2, HsfA3 und HsfA4b wiederhergestellt werden kann. Untersucht wurde auch hier (1) der Schutz des thermosensitiven Reporterproteins Luciferase, (2) die Induktion der Expression endogener Hsp und (3) die Bildung von HSG-Komplexen.

**(3) Funktion von sHsp, Hsp70 und Hsp101 in der Thermotoleranz**

Durch transiente Expression in CS-Protoplasten wurde die Chaperonaktivität von Hsp anhand ihres Einflusses auf die Denaturierung und Rückfaltung von Luciferase nach einem Hitzestress untersucht. Ein weiterer Ansatz war die Verwendung der RNAi-Technologie: Expressionsplasmide, die *inverted repeats* (IR) von für Hsp kodierender cDNA enthalten, wurden transient in Protoplasten exprimiert.

**(4) Oligomerisierung und Interaktion cytoplasmatischer sHsp**

Über Immunoblot-Analysen von nativen Polyacrylamidgelen und indirekte Immunfluoreszenz wurden das Oligomerisierungsverhalten und die intrazelluläre Lokalisation von sHsp analysiert. Es wurde der Frage nachgegangen, ob auf Ebene der Oligomerbildung Interaktionen zwischen Vertretern der cytoplasmatisch lokalisierten Klassen CI, CII und CIII stattfinden, und ob diese ihre intrazelluläre Lokalisation wechselseitig beeinflussen.

**(5) Interaktion cytoplasmatischer sHsp mit HsfA2**

In diesem Teil meiner Arbeit wurde der spezifische Einfluss von sHsp der Klasse CII auf die Aggregation von HsfA2 und der Einfluss von Hsp 17-CI auf diese Interaktion untersucht.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Allgemeine Methoden**

Plasmidpräparation, Restriktionsverdau, Ligation und Transformation in *E. coli* erfolgten entsprechend dem Standardprotokoll (Sambrook und Russell, 2000). Für die Transformation von Plasmiden und deren Präparation wurde der Bakterienstamm *E. coli* DH5 $\alpha$  verwendet (Hanahan, 1983). Für den Restriktionsverdau von DNA wurden Enzyme und Puffer der Firmen Roche Diagnostics, Mannheim und MBI Fermentas, St. Leon-Rot gemäß den Empfehlungen des Herstellers verwendet.

### **2.2 Reverse Transkription und PCR**

RNA aus Protoplasten wurde mit Hilfe des „RNeasy mini kits“ (QIAGEN, Hilden) isoliert. Für die reverse Transkription wurde M-MuLV reverse Transkriptase (MBI Fermentas) verwendet. Für die Reaktion wurde 1  $\mu$ g RNA eingesetzt. Die Amplifikation von cDNA erfolgte mit Taq-Polymerase (MBI Fermentas). Wurde cDNA zur Klonierung amplifiziert, wurde Pfu (*proof reading*)-Polymerase (MBI Fermentas) verwendet. Die DNA-Amplifikation wurde im „GeneAmp PCR System 9700“ (Applied Biosystems, Langen) unter folgenden Temperaturbedingungen durchgeführt: Auf 5 min Denaturierung bei 95°C folgten, soweit nicht anders angegeben, 30 Zyklen (Denaturierung 30 s 94°C, *annealing* 30 s 55°C, Synthese 1 min 72°C) und ein abschließender Syntheseschritt für 7 min bei 72°C. Eine Zusammenstellung der verwendeten Primer findet sich im Anhang (Tab. 8, Tab. 9). Für die Klonierung verwendete PCR-Produkte wurden mit dem „PCR-Purification-Kit“ (QIAGEN) gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt.

### **2.3 Herstellung pflanzlicher Expressionsvektoren**

Geschnittene Vektoren und Insertionsfragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, ausgeschnitten und unter Verwendung des „QIAquick Gel Extraction Kit“ (QIAGEN) gereinigt. Für die Ligation wurde T4 –DNA-Ligase (Roche Diagnostics) verwendet. Eine Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Expressionsvektoren befindet sich im Anhang in Tab. 7.

## 2.4 Aufarbeitung und Transformation von Tomatenprotoplasten

Verwendet wurden etwa zwei Monate alte, sterile Tomatenpflanzen der Art *Lycopersicon esculentum* cv. „Moneymaker“, die auf hormonfreiem MS-Medium angezogen wurden (Murashige und Skoog, 1962). Die Herstellung der Tomatenprotoplasten wurde wie bei Mishra et al., 2002 beschrieben durchgeführt. Die Protoplastensuspension wurde mit K3M auf etwa  $10^6$  Protoplasten/ ml eingestellt. Für die PEG-vermittelte Transformation wurden 100  $\mu$ l der Protoplastensuspension pro Transformationsansatz sowie 100  $\mu$ l PEG-Lösung (25 % PEG 6000; 0,45 M Mannitol; 0,1 M Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O; pH 6,0) eingesetzt. Nach 20 min bei Raumtemperatur wurde die Transformation durch Zugabe von einem ml K3M gestoppt. Zur Proteinexpression wurden die Tomatenprotoplasten über Nacht bei 25°C im Dauerlicht inkubiert und dann für weitere Experimente verwendet.

Zur Transformation wurden pro  $10^5$  Protoplasten folgende DNA-Mengen eingesetzt: 7  $\mu$ g Luciferase-Expressionsplasmid sowie jeweils 15  $\mu$ g der Hsp- bzw. Hsf-Expressionsplasmide, soweit nicht anders angegeben. Um eine cytoplasmatische Lokalisation der Luciferase zu gewährleisten, wurde eine Variante verwendet, deren C-terminale Signalsequenz für den peroxisomalen Import, SKL, durch die Aminosäurereste IAV ersetzt ist (Sherf und Wood, 1994). Die Plasmid-Gesamtmenge in verschiedenen Transformationsansätzen wurde durch Zugabe von leerem Vektor angeglichen. Zur Herstellung der oben genannten Konstrukte wurden pRT-Vektoren bzw. der Vektor pRTdS verwendet. Dabei handelt es sich um pflanzliche Expressionsvektoren, die über einen 35S-Promotor, ein Polyadenylierungssignal aus dem Blumenkohlmosaikvirus (CaMV), und ein Ampicillinresistenzgen verfügen (Töpfer et al., 1988). Der Vektor pRTdS verfügt über einen doppelten 35S-Promotor und einen TEV (*tobacco etch virus*)-enhancer (Reichel et al., 1996). Die Plasmid-DNA wurde entsprechend dem Protokoll für Midi-Präparationen isoliert (Sambrook and Russell, 2000). Eine Zusammenstellung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Expressionsplasmide findet sich im Anhang in Tab. 6.

## 2.5 Indirekte Immunfluoreszenz und Elektronenmikroskopie

Indirekte Immunfluoreszenz und Elektronenmikroskopie erfolgten abgesehen von geringfügigen Änderungen wie bei Kirschner et al. (2000) beschrieben: Die fixierten und permeabilisierten Zellen wurden mit den primären Antisera, die in 5 % BSA in

PBS verdünnt wurden, für 3 h bei Raumtemperatur behandelt. Die sekundären Antiseren wurden ebenfalls verdünnt in 5 % BSA in PBS aufgebracht. Die Inkubationsdauer betrug 2 h bei Raumtemperatur. Nähere Informationen zu den verwendeten Antiseren und deren Verdünnung finden sich im Anhang in Tab. 5. Zur Dokumentation der Immunfluoreszenzbilder wurde ein konfokales Laserscan Mikroskop (CLSM) (Leica, Wetzlar) verwendet. Die digitale Bearbeitung der Bilder erfolgte mit der Software Imaris 3.02, Bitplane AG, Zürich, Schweiz.

## **2.6 Messung der Luciferaseaktivität**

Die Denaturierung der Luciferase erfolgte durch eine Hitzeperiode für 30 min bei 41°C. Auf die Denaturierung folgte eine Renaturierungsphase für 120 min bei 26°C. Um eine Neusynthese der Luciferase in der Renaturierungsphase zu unterdrücken, wurde direkt nach der Denaturierung Cycloheximid (CH; 10 µg/ ml) zugegeben. Eine Probenentnahme erfolgte direkt vor und nach der Denaturierung sowie in der Renaturierungsphase alle 40 min. Zur Kontrolle wurde eine Probe konstant bei 25°C gehalten. Eine weitere Probe wurde zur Induktion von Thermotoleranz vor der Denaturierung einer Vorbehandlung unterzogen (Präinduktion): Dies erfolgte durch eine Hitzeperiode für 15 min bei 40°C, gefolgt von einer dreistündigen Erholungsphase bei 25°C. Präinduktion und Hitzestress wurden im Wasserbad im Licht durchgeführt. Zu jedem Messpunkt wurden drei Parallelproben zu jeweils 40 µl entnommen und auf eine 96 *well*-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Messung selbst erfolgte im Mikrolumat LB 96 P (EG & G Berthold, Bad Wildbad). Zu jeder Probe wurden 100 µl Substratlösung (25 mM Glycylglycin; 15 mM Kaliumphosphat; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 4 mM EGTA; 1 mM DTT; 2 mM ATP; 1 mM Luciferin; 100 mM Triton X 100; pH 7,8) injiziert (Forreiter et al., 1997). Die Intensität des in der darauf folgenden Reaktion emittierten Lichtes wurde über ein Zeitintervall von 20 s bestimmt. Aus den zu jedem Messpunkt ermittelten drei Messwerten wurde der Mittelwert errechnet. Die vor der Denaturierung gemessene Luciferaseaktivität wurde gleich 100 % gesetzt, und die nach der Denaturierung gemessenen Werte wurden auf diesen Wert bezogen. Die Auswertung der Messdaten und die Erstellung der Diagramme erfolgte mit Excel 97 (Microsoft).

## **2.7 Herstellung von Proteinextrakten und Immunoblot-Analyse**

Zur Herstellung von Proteinextrakten aus Tomatenprotoplasten wurde wie folgt verfahren: Die Protoplasten wurden durch Zentrifugation bei 10.000 g für 5 min

sedimentiert. Das Pellet wurde in nativem Probenpuffer (50 mM Tris/ HCl pH 7,8; 5 % Glycerol; 14,2 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol; 1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ; 25 mM NaCl; 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; Pefabloc (Roche Diagnostics, Mannheim)) aufgenommen. Die Zellen wurden durch Ultraschallbehandlung (Sonopuls HD70, Bandelin Electronic, Berlin) aufgeschlossen. Nach Zentrifugation für 5 min bei 10.000 g und 4°C wurde der Überstand abgenommen. Für die nicht-denaturierende Gelelektrophorese wurde der Überstand direkt auf ein Gradientengel (3,4 bis 20 % Polyacrylamid; Chen et al., 1994) aufgetragen. Die aufgetragene Proteinmenge entsprach dabei dem Proteingehalt von 40.000 Protoplasten.

Für die denaturierende SDS-Gelelektrophorese wurden die Proteinextrakte mit 2 x SDS-Probenpuffer (2 % SDS; 30 % Glycerol; 125 mM Tris/ HCl pH 6,8; 2 % Bromphenolblau; 200 mM DTT) versetzt, für 5 min auf 95°C erhitzt und auf ein diskontinuierliches 15 %-SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die pro Tasche aufgetragene Proteinmenge entsprach dabei dem Proteingehalt von ca. 20.000 Protoplasten.

Für die 2-D-Gelelektrophorese wurden die im Extrakt enthaltenen Proteine durch Zugabe von 4 Vol. Aceton über Nacht bei -20°C gefällt. Die Proteinmenge entsprach dabei dem Proteingehalt von 400.000 Protoplasten. Nach Zentrifugation für 5 min bei 14.000 g und 4°C wurden die gefällten Proteine zweimal in 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 200  $\mu\text{l}$  2-D-Probenpuffer (9 M Harnstoff; 2 %  $\beta$ -Mercaptoethanol; 1 % DTT; 2 % Pharmalyte pH 3-10 (Amersham Biosciences, Freiburg); 0,5 % Triton X 100) gelöst. Der Proteinextrakt wurde dann mit „Immobiline<sup>TM</sup> DryStrips“ pH 3-10 (Amersham Biosciences) über Nacht inkubiert. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte bei 16°C. Die Streifen wurden anschließend in 10 ml Equilibrierungslösung (50 mM Tris-HCl pH 6,8; 6 M Harnstoff; 30 % Glycerol; 1 % SDS) equilibriert. Zur Trennung der Proteine in der zweiten Dimension wurden die Streifen auf ein diskontinuierliches 15 %-SDS-Polyacrylamid-Gel aufgelagert.

Die Immunoblot-Analyse erfolgte nach dem „Semi-Dry-Blotting“-Verfahren (Sambrook und Russell, 2000) unter Verwendung von „Roti-Blot“-Transferpuffer (Roth, Karlsruhe). Für den immunologischen Nachweis der Proteine wurden die Primär- sowie die Sekundäntisera in 5 % Magermilchpulver in PBS eingesetzt. Eine Zusammenstellung der verwendeten Primär- und Sekundäntisera findet sich in

Tab. 5. Der Peroxidase-Nachweis erfolgte nach dem ECL-System (*enhanced chemoluminescence detection system*) (NEN<sup>TM</sup>, Boston, USA). Die Dokumentation erfolgte auf einem Röntgenfilm. Die Röntgenfilme wurden eingescannt und digital weiterbearbeitet (Adobe Photoshop 7.0, Adobe Systems).

## 3 Ergebnisse

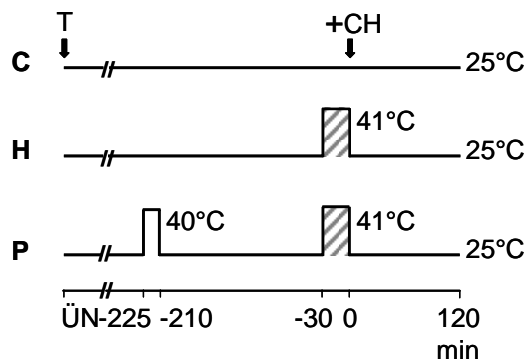
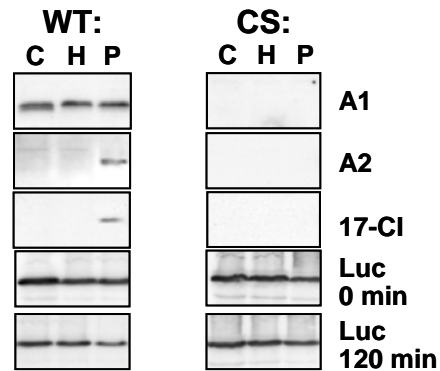
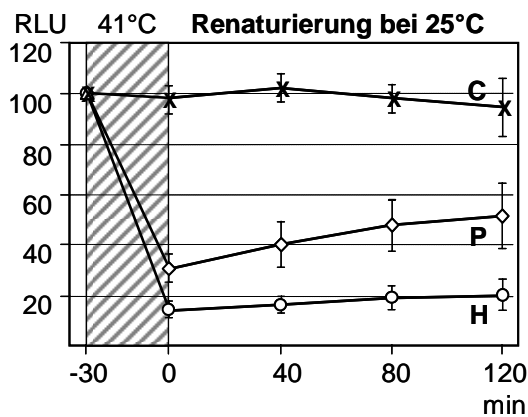
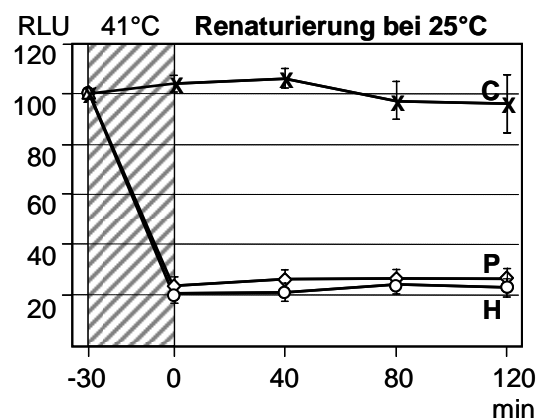
### 3.1 Thermotoleranz von CS-Protoplasten

Wie bereits in der Einleitung ausgeführt wurde, weisen CS-Pflanzen infolge eines Cosuppressionseffektes eine stark verminderte Expression von HsfA1 auf. Dies wiederum führt zu einem Fehlen induzierter Hsp-Synthese sowie zu einem Fehlen der Expression der hitzestressinduzierten Transkriptionsfaktoren HsfA2 und HsfB1. CS-Pflanzen und –Früchte erwiesen sich als extrem hitzesensitiv (Mishra et al., 2002). Im folgenden Abschnitt sind Ergebnisse von Experimenten dargestellt, die Aufschluss über die Auswirkungen des Fehlens induzierter Hsp-Synthese auf zellulärer Ebene geben. Dazu wurden Mesophyllprotoplasten aus CS-Pflanzen verwendet. Das Hauptaugenmerk der Untersuchungen lag auf drei Kriterien: (1) Protektion von Luciferase unter Hitzestress und ihre Renaturierung nach dem Hitzestress, (2) Expression endogener Hsp, nachgewiesen über Immunoblot-Analyse, sowie (3) Bildung cytoplasmatischer Multi-Chaperon-Komplexe (HSG-Komplexe). Die in Abb. 4, Abb. 5 und Abb. 6 gezeigten Ergebnisse sind in einer gemeinsamen Arbeit mit Shravan Kumar Mishra publiziert (Mishra et al., 2002). Es sind nur die Teile der Publikation dargestellt, die im Rahmen meiner experimentellen Arbeiten entstanden sind.

#### 3.1.1 Protektion von Luciferase in CS-Protoplasten

Im folgenden Experiment wurde der Einfluss des Fehlens HsfA1-abhängiger Expression von Hsp auf die Inaktivierung des thermosensitiven Reporterproteins Luciferase während eines Hitzestresses und die Reaktivierung in einer darauf folgenden Erholungsphase dargestellt. Für die Luciferasemessung wurden WT- und CS-Protoplasten mit einem Expressionsplasmid, das für *Photinus pyralis*-Luciferase kodiert, transformiert. Informationen zu der Transformation der verschiedenen Proben sowie zur der Hitzestressbehandlung, der sie unterzogen wurden, finden sich im Piktogramm sowie in der Legende in Abb. 4. Nach Inkubation der Protoplasten über Nacht wurden drei verschiedene Hitzestressbehandlungen angewendet: (1) Eine Kontrollprobe (Probe C) wurde während des gesamten Versuchsverlaufes konstant bei 25°C gehalten. (2) Zur Expression endogener Hsp wurde die Probe P für 15 min bei 40°C inkubiert (Präinduktion), gefolgt von einer dreistündigen Erholungsphase bei 25°C. (3) Probe H wurde nicht präinduziert.



**A: Temperaturbehandlung****B: Immunoblot****C: WT****D: CS****Abb. 4: Messung der Luciferaseaktivität in Tomatenmesophyllprotoplasten.**

Die jeweils drei Proben mit Protoplasten aus WT- und CS-Pflanzen wurden mit Luciferase-Expressionsplasmid transformiert. Nach Inkubation über Nacht bei 25°C (ÜN) wurden die Proben drei unterschiedlichen Behandlungen unterzogen, wie sie in den Piktogrammen in A dargestellt sind. Kontrollproben (Probe C) wurden bei 25°C gehalten; Probe P wurde für 15 min bei 40°C präinduziert, gefolgt von einer dreistündigen Expressionsphase, die die Akkumulation endogener Chaperone ermöglicht. Die Probe H wurde nicht präinduziert. Zur Denaturierung der Luciferase wurden die Proben P und H für 30 min einem Hitzestress bei 41°C unterzogen und daraufhin zur Renaturierung für 120 min bei 25°C inkubiert. Cycloheximid (CH, 10 µg/µl) wurde allen Proben zu Beginn der Renaturierungsphase zugegeben. (B) Die Proben zur Immunoblot-Analyse der zugehörigen Protoplastenextrakte wurden am Ende der Renaturierungsphase genommen. Die detektierten Proteine sind am Rand angegeben. (C, D) Die in den Diagrammen dargestellten und mit Protoplasten aus WT-(C) und CS-Pflanzen (D) ermittelten Werte basieren auf der Luciferaseaktivität in relativen Lichteinheiten (RLU), die in % bezogen auf die Aktivität vor der Denaturierung (=100 %) angegeben ist. Die Messung wurde dreimal durchgeführt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an.

Probe P und H wurden daraufhin zur Denaturierung der Luciferase einem Hitzestress für 30 min bei 41°C unterzogen und dann, um eine Renaturierung der Luciferase zu ermöglichen, für zwei Stunden bei 25°C inkubiert. Die Luciferaseaktivitäten wurden vor und nach der Denaturierungsphase, sowie in der darauf folgenden Renaturierungsphase in Intervallen von 40 min gemessen. Die relative Luciferaseaktivität bezogen auf die Ausgangsaktivität vor der Denaturierung (=100 %) ist in den Diagrammen in Abb. 4C und D dargestellt. In den entsprechenden Immunoblot-Analysen wurde das Expressionsniveau von Luciferase, HsfA1, HsfA2, sowie von Hsp17-CI als Indikator für das endogene Chaperonsystem nachgewiesen (Abb. 4B).

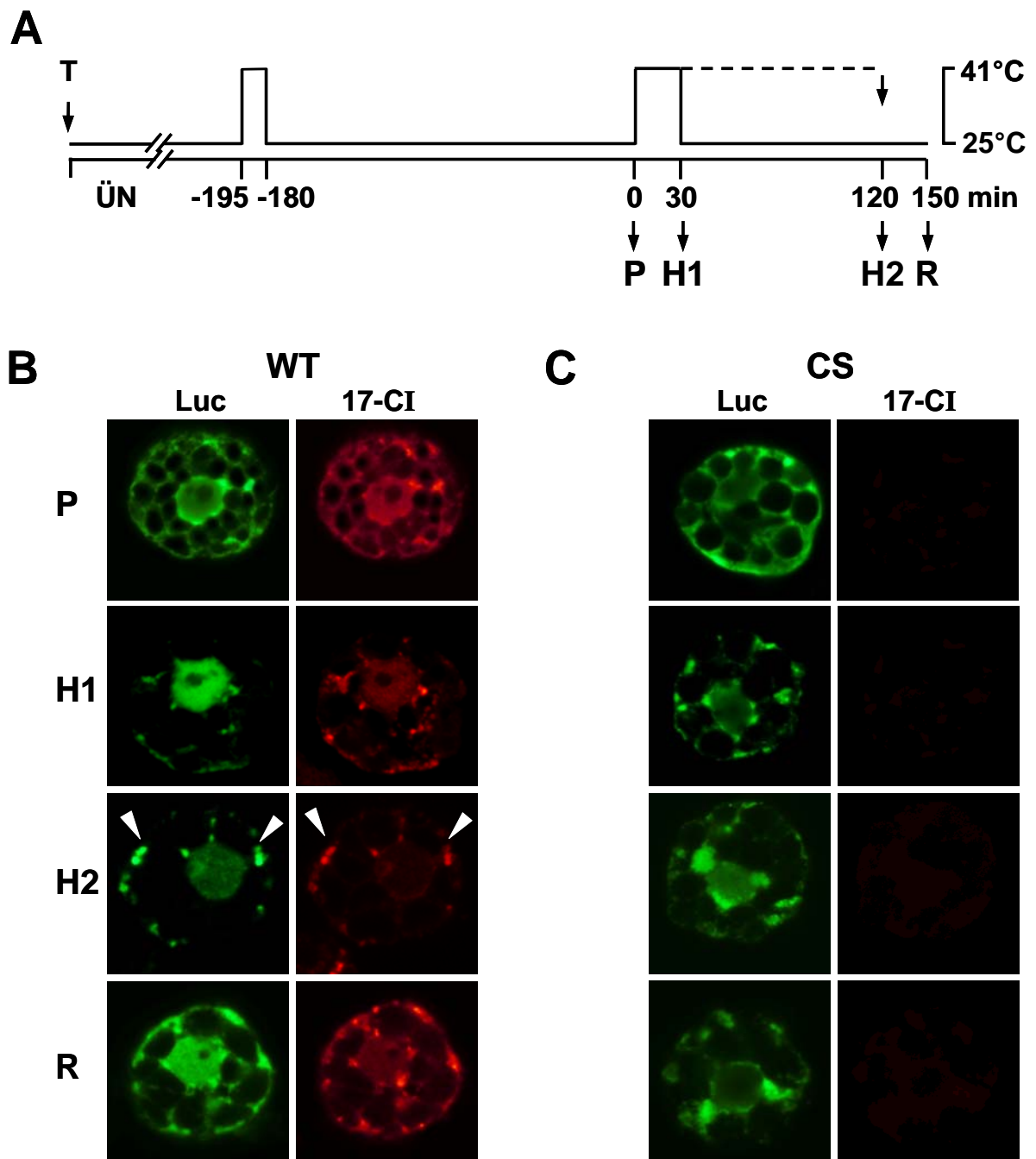
Die mit WT-Protoplasten erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass Luciferase nach der 23 stündigen Expressionsphase gut exprimiert wurde (siehe Immunoblot in Abb. 4B). Das Enzym wurde während der 30 minütigen Inkubation bei 41°C stark denaturiert, das Ausmaß der Denaturierung hing allerdings von der Vorbehandlung der Protoplasten ab (Abb. 4C). Ohne Vorbehandlung (Probe H) war die Denaturierung sehr stark, und es fand fast keine Renaturierung statt, wohingegen die Luciferase in thermotoleranten Protoplasten (Probe P) vor Denaturierung geschützt war. Weiterhin kam es zu einer deutlich sichtbaren Renaturierung von 30 auf 50 % im Verlauf der zweistündigen Erholungsphase. Die Menge an Luciferase änderte sich im Verlauf der Messung nicht (siehe Immunoblots in Abb. 4B). Um jeden Einfluss einer *de novo*-Synthese der Luciferase in der Erholungsphase auszuschließen, wurde nach der Denaturierung Cycloheximid zugegeben (10 µg/ml). Wie erwartet, unterschieden sich die mit CS-Protoplasten erhaltenen Ergebnisse in einem wichtigen Aspekt von den mit WT-Protoplasten erhaltenen (Abb. 4D): Die Vorbehandlung der Protoplasten hatte keinen schützendem Effekt (Probe P). Ähnlich wie in Probe H nahm die Luciferaseaktivität in Probe P während des Hitzestresses bei 41°C stark ab und stieg in der anschließenden Erholungsphase nicht wieder an. Dieser Defekt in der Induktion der Thermotoleranz zeigte sich auch auf der Proteinebene im Fehlen der Expression von Hsp17-CI und HsfA2 (Abb. 4B, Probe P). Die Ergebnisse zeigen, dass die transiente Expression der *Photinus pyralis*-Luciferase in Pflanzenprotoplasten genutzt werden kann, um Aufschluss über den Status des endogenen Chaperonsystems zu geben.

### **3.1.2 Die Bildung von Hitzestressgranula korreliert mit dem Schutz der Luciferase**

HSG-Komplexe können in Pflanzenzellen eine Größe von mehreren  $\mu\text{m}$  erreichen und sind gewöhnlich aus hunderten von 40 nm Partikeln zusammengesetzt. Neben Hsp70 enthalten sie cytoplasmatische sHsp sowie HsfA2 (Nover et al., 1983; Scharf et al., 1998). Da all diese Komponenten in CS-Protoplasten fehlen, stellte sich die Frage, ob HSG-Komplexe in CS-Protoplasten vorhanden sind und ob die Protektion der Luciferase in Zusammenhang mit einer Bindung an die HSG-Komplexe steht. Um diese Fragen zu beantworten, wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz die Expression und intrazelluläre Lokalisation von Luciferase und Hsp17-CI in WT- und CS-Protoplasten untersucht (Abb. 5). Hsp17-CI diente hier als Indikator für die Bildung von HSG-Komplexen und die Expression endogener, hitzestressinduzierter Gene. Informationen zur Hitzestressbehandlung und Transformation der Proben sind im Piktogramm in Abb. 5A angegeben.

Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden:

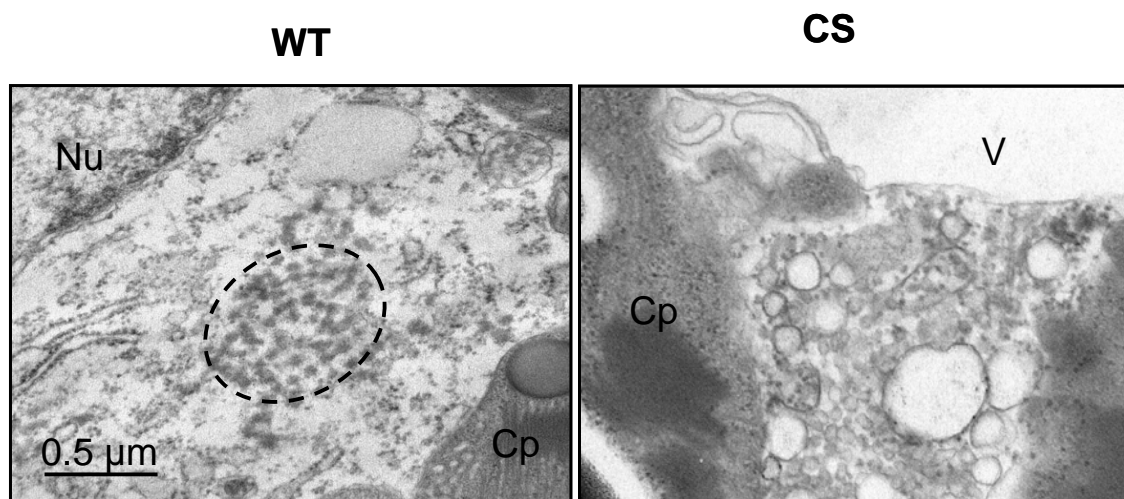
Nach einer Präinduktion der Protoplasten für 15 min bei 40°C und einer Erholungsphase für 3 h bei 25°C waren sowohl Hsp17-CI (roter Kanal) als auch Luciferase (grüner Kanal) in WT-Protoplasten gleichmäßig in Zellkern und Cytoplasma verteilt (Abb. 5B, Probe P). Die netzartige Struktur in der Immunfluoreszenz wird durch die Verteilung des Cytoplasmas in Form schmaler Stränge verursacht, zwischen denen sich die nicht markierten Chloroplasten befinden. Während des folgenden Hitzestresses für 30 min bei 41°C wurden Hsp17-CI und Luciferase in HSG-Komplexe eingebaut (Probe H1), nach 120 min bei 41°C (Probe H2) war dies noch deutlicher zu beobachten. Folgte auf den Hitzestress von 30 min bei 41°C eine Erholungsphase von 2 h bei 25°C, kam es zu einer Freisetzung sowohl von Hsp17-CI als auch der Luciferase aus den HSG-Komplexen (Probe R). In Protoplasten aus CS-Pflanzen konnte keine Synthese von Hsp17-CI und folglich auch keine Bildung von HSG-Komplexen nachgewiesen werden. Jedoch kam es im Verlauf des Hitzestresses zu einer irreversiblen Aggregation der Luciferase (Abb. 5C Proben H1, H2 und R).



**Abb. 5: Intrazelluläre Lokalisation von Luciferase, HsfA2 und Hsp17-CI.**

Details über die Transformation und das HS-Regime sind im Piktogramm in (A) dargestellt. Protoplasten aus WT (B) und CS-Pflanzen (C) wurden mit Luciferase-Expressionsplasmid transformiert und über Nacht (ÜN) inkubiert. Auf eine Präinduktion für 15 min bei 40°C folgte eine dreistündige Erholungsphase (Probe P). Anschließend wurden die Protoplasten einem weiteren Hitzestress für 30 min bei 41°C (Probe H1) ausgesetzt, gefolgt von einer zweistündigen Erholungsphase (Probe R). Probe H2 wurde einer längeren HS-Behandlung für 120 min bei 41°C unterzogen. Luciferase (Luc) wurde im grünen, Hsp17-CI (17-CI) im roten Kanal nachgewiesen. Die Pfeile markieren HSG-Komplexe.

Doch nur eine elektronenmikroskopische Analyse der Protoplasten kann Aufschluss darüber geben, ob es in CS-Protoplasten wirklich zu keiner Bildung von HSG-Komplexen kommt (Abb. 6). Die Untersuchung der Ultrastruktur von WT und CS-Protoplasten nach einer Hitzestressbehandlung ergab, dass in WT-Protoplasten die typischen 40 nm-Partikel der HSG-Komplexe nachgewiesen werden konnten. (siehe eingekreiste Bereiche in Abb. 6). In CS-Protoplasten dagegen waren keine HSG-Komplexe nachweisbar.



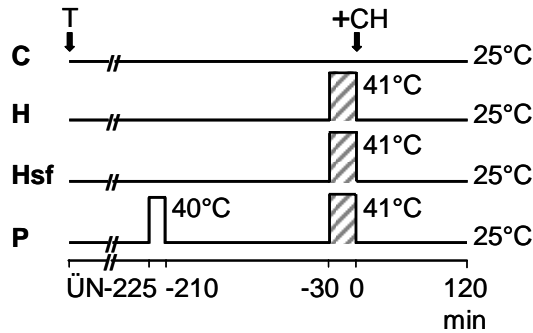
**Abb. 6: Ultrastruktur von WT- und CS-Protoplasten.**

Protoplasten wurden mit leerem Vektor transformiert. Nach Inkubation über Nacht wurden sie für 15 min bei 40°C präinduziert. Nach 3 h Kultivierung bei 25°C wurden sie einem zweiten HS für 2 h bei 41°C unterzogen (siehe auch Piktogramm in Abb. 5, Probe H2). Cp, Chloroplast; Mi, Mitochondrium; Nu, Nukleus; V, Vakuole. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 0,5 µm. HSG-Komplexe sind mit einer gestrichelten Linie umrandet. Die Abbildung entstand in Zusammenarbeit mit Sybille Winkelhaus.

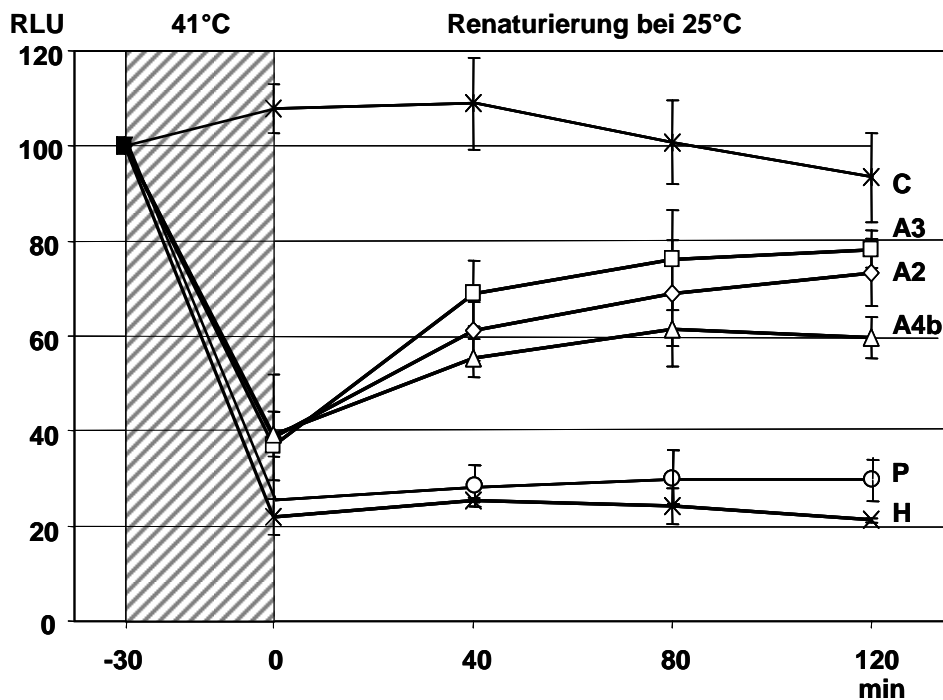
### 3.2 Wiederherstellung von Thermotoleranz durch transiente Expression von Hsf

Es stellte sich die Frage, ob die Thermotoleranz von CS-Protoplasten durch transiente Expression von Hsf wiederhergestellt werden kann. Um dies zu beantworten, wurden die Protoplasten mit Expressionsplasmiden, die für Luciferase, sowie für HsfA2, HsfA3 oder HsfA4b kodieren (Proben A2, A3 und A4b in Abb. 7B), oder leerem Vektor als Kontrolle kotransformiert. Die Hitzestressbehandlung der Protoplasten ist im Piktogramm in Abb. 7A dargestellt. Die Tatsache, dass Zellen, die Luciferase exprimieren, gleichzeitig mit Hsf-Expressionsvektoren kotransformiert sind, stellt einen großen Vorteil dieses Testsystems dar: Im Gegensatz zur Immunoblot-Analyse, in der auch Zellen, die keine Hsf exprimieren das Ergebnis beeinflussen, wurden hier nur Effekte gemessen, die auf die Expression von Hsf zurückzuführen sind.

Offensichtlich induzierten alle drei Hsf auch in Abwesenheit von HsfA1 die Synthese von Komponenten, die für den thermotoleranten Zustand verantwortlich sind (Abb. 7C). Die Transformation der Protoplasten mit den entsprechenden Expressionsplasmiden führte zu einer verbesserten Protektion der Luciferase nach dem Hitzestress und zu einer gesteigerten Renaturierung in der darauf folgenden, zweistündigen Erholungsphase. Dabei war die Expression aller drei Hsf offenbar gleich effektiv, was die Protektion nach dem Hitzestress betraf, die Renaturierung war allerdings bei Expression von HsfA2 und HsfA3 im Vergleich zu HsfA4b stärker ausgeprägt. Es blieb allerdings unklar, ob die beobachteten Unterschiede auf einem quantitativen oder einem qualitativen Effekt beruhen, d. h. ob sie auf eine insgesamt unterschiedlich starke Expression von Hsp zurückgehen oder ob die Hsf ein unterschiedliches Muster der Genexpression erzeugen. Dieser Frage bin ich im nächsten Versuchsteil nachgegangen.

**A: Temperaturbehandlung****B: Transformation mit:**

	Hsf	Luc	Vektor
C	-	+	+
H	-	+	+
Hsf	+	+	-
P	-	+	+

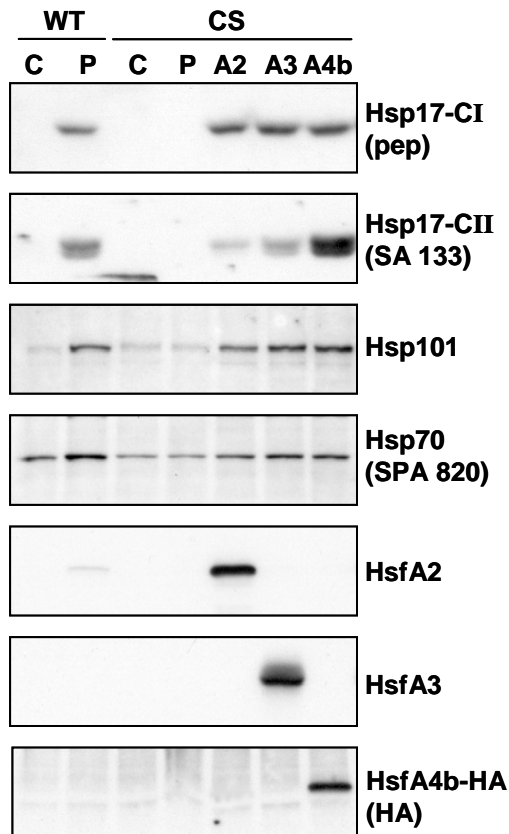
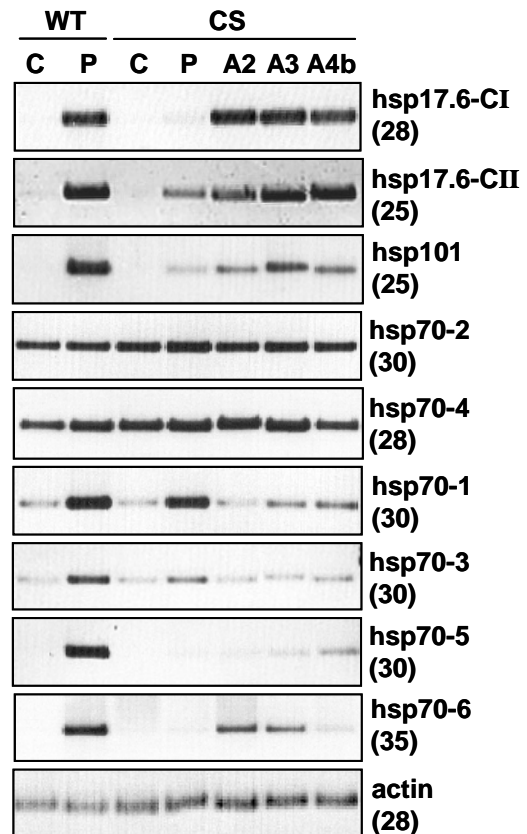
**C: Luciferasemessung****Abb. 7: Messung der Luciferaseaktivität in Tomatenmesophyllprotoplasten.**

(A, B) Die sechs Proben mit Protoplasten aus CS-Pflanzen wurden mit Luciferaseexpressionsplasmid sowie mit HsfA2- (A2), HsfA3- (A3) oder HsfA4b-HA- (A4b) Expressionsplasmid oder leerem Vektor (Proben C, P und H) transformiert. Nach Inkubation über Nacht bei 25°C (ÜN) wurden die Proben den Behandlungen unterzogen, die in den Piktogrammen in A dargestellt sind. C: Kontrollproben wurden bei 25°C gehalten; P: Die Proben wurden für 15 min bei 40°C präinduziert, gefolgt von einer dreistündigen Expressionsphase, die die Akkumulation endogener Chaperone ermöglichte. Die Proben H, A2, A3 und A4b wurden nicht präinduziert. Zur Denaturierung der Luciferase wurden die Proben P, H, A2, A3 und A4b für 30 min einem Hitzestress bei 41°C unterzogen und daraufhin zur Renaturierung für 120 min bei 25°C inkubiert. Allen Proben wurde zu Beginn der Renaturierungsphase Cycloheximid (CH, 10 µg/µl) zugegeben. (C) Die in den Diagrammen dargestellten Werte wurden wie bereits in Abb. 4 beschrieben ermittelt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an.

Im folgenden Versuch wurde genauer analysiert, welche Komponenten des endogenen Chaperonsystems durch die transiente Expression der Hsf in Protoplasten induziert werden und somit zu dem thermotoleranten Zustand der Protoplasten beitragen könnten. Eine weitere Fragestellung des Versuchs war, ob die verschiedenen Hsf in der Lage sind, spezifisch bestimmte Promotoren anzusprechen und damit ein charakteristisches Muster der Genexpression zu erzeugen. Um diese Fragen zu beantworten, wurden CS-Protoplasten mit pRTHsfA2, pRTHsfA3 oder pRTdSHsfA4b-HA transformiert und die Expression endogener Hsp auf Proteinebene durch Immunoblot-Analyse, sowie auf Ebene der mRNA mittels RT-PCR untersucht (Abb. 8). Die Ergebnisse der Immunoblot-Analyse lassen sich wie folgt zusammenfassen (Abb. 8A):

- Die Expression der drei Hsf war in den entsprechend transformierten Proben gut nachweisbar, ebenso wie die Expression von endogenem HsfA2 in präinduzierten WT-Protoplasten.
- Hsp17-CI wurde in präinduzierten WT-Protoplasten und in CS-Protoplasten, die mit für HsfA2, HsfA3 und HsfA4b kodierenden Expressionskonstrukten transformiert wurden, gleichermaßen exprimiert.
- Die Expression von Hsp17-CII wurde in WT-Protoplasten ebenfalls durch eine Präinduktion angeregt. Auch fand eine Induktion der Expression von Hsp17-CII in CS-Protoplasten sowohl bei Expression von HsfA2 als auch von HsfA3 und HsfA4b statt. Allerdings zeigte sich hier ein Unterschied: Die Induktion der Expression von Hsp17-CII durch HsfA4b war deutlich stärker als durch HsfA2 oder HsfA3.
- Die Expression von Hsp101 wurde in WT-Protoplasten durch eine Präinduktion oder in CS-Protoplasten durch eine Transformation mit pRTHsfA2, pRTHsfA3 oder pRTdSHsfA4b-HA induziert.
- Hsp70 wurde in CS- und WT-Protoplasten konstitutiv exprimiert. Auch hier kam es in WT-Protoplasten nach einer Präinduktion, bzw. in CS-Protoplasten nach einer Transformation mit Hsf-Expressionsplasmiden zu einer gesteigerten Expression.



**A: Immunoblot****B: RT-PCR**

**Abb. 8: Hsf-induzierte Expression von Proteinen und mRNA in WT- und CS-Protoplasten.**

Protoplasten aus CS-Pflanzen wurden entweder mit pRTHsfA2 (A2), pRTHsfA3 (A3), oder pRTdSHsfA4b-HA (A4b) bzw. mit leerem Vektor (Proben C und P) transformiert. Proben mit Protoplasten aus WT-Pflanzen wurden ausschließlich mit leerem Vektor transformiert (Proben C und P). Nach Inkubation über Nacht bei 25°C wurden die Proben C, A2, A3 und A4b geerntet. Probe P wurde für 15 min bei 40°C präinduziert und dann für 3 h bei 25°C inkubiert. (A) Immunoblot-Analyse der Protoplastenextrakte. Die verwendeten Antiseren sind an der rechten Seite angegeben. (B) Analyse der Expression von mRNA über RT-PCR. Die Synthese der cDNA erfolgte unter Verwendung eines Oligo-dT-Primers. Die Bezeichnungen der amplifizierten Transkripte sind an der rechten Seite angegeben. Die Anzahl der Zyklen, die zur Amplifikation der betreffenden cDNA benötigt wurde, findet sich, in Klammern gesetzt, ebenfalls am rechten Rand.

Da es auf Proteinebene nicht möglich war, zwischen konstitutiv exprimierten und hitzestressinduzierbaren Isoformen der Hsp70-Familie zu unterscheiden, wurde eine RT-PCR-Analyse durchgeführt. Unter Verwendung genspezifischer reverser Primer, die an die 3'-UTR binden, war es möglich, die Transkripte verschiedener Isoformen von Hsp70 zu unterscheiden. Eine Analyse der Expression der für Hsp17-CI, Hsp17-CII und Hsp101 kodierenden mRNA wurde exemplarisch an jeweils einem Beispiel durchgeführt (Abb. 8B). Bezüglich der Expression der Hsp70-kodierenden mRNA lässt sich folgendes festhalten:

- hsp70-2 und hsp70-4 wurden konstitutiv exprimiert, und die Expression blieb sowohl von einer Präinduktion als auch vom Fehlen von HsfA1 unbeeinflusst. Auch die Expression von HsfA2, HsfA3 und HsfA4b bewirkte keine gesteigerte Expression.
- hsp70-1 und hsp70-3 wurden bereits unter Kontrollbedingungen exprimiert, die Expression war jedoch sowohl in WT- als auch in CS-Protoplasten nach einer Präinduktion erhöht. Es fand keine Induktion durch die Expression der drei Hsf statt.
- Die Expression von hsp70-5 und hsp70-6 war stark hitzestressinduziert und abhängig von der Anwesenheit von HsfA1. Die mRNA beider Isoformen wurde auch nach Transformation der CS-Protoplasten mit pRTHsfA2, pRTHsfA3 und pRTdSHsfA4b-HA verstärkt gebildet, wobei allerdings HsfA4b bezüglich der Expression von hsp70-5 den stärksten Effekt zeigte. Bei Nachweis von hsp70-6 war die Expression nach Transformation mit pRTHsfA2 am stärksten.

Die Induktion der Expression der für Hsp17.6-CI, Hsp17.6-CII und Hsp101 kodierenden mRNA verhielt sich in etwa so, wie es anhand der mittels Immunoblot-Analyse ermittelten Daten erwartet werden konnte. Eine Abweichung zeigte sich bei der Expression von Hsp17.6-CII und dessen mRNA: Während in präinduzierten CS-Protoplasten auf Proteinebene keine Expression nachweisbar war, kam es auf Ebene der mRNA zu einer vergleichsweise starken Expression.

Um genauer zu analysieren, ob auch einzelne Vertreter der Klassen CI und CII einer spezifischen Regulation unterliegen, wurde die Hsf-induzierte Bildung von Proteinen dieser beiden Klassen mittels zwei-dimensionaler Gelelektrophorese untersucht. Eine Übersicht über die Vertreter der Klassen CI und CII und deren Eigenschaften findet sich in Tab. 2.

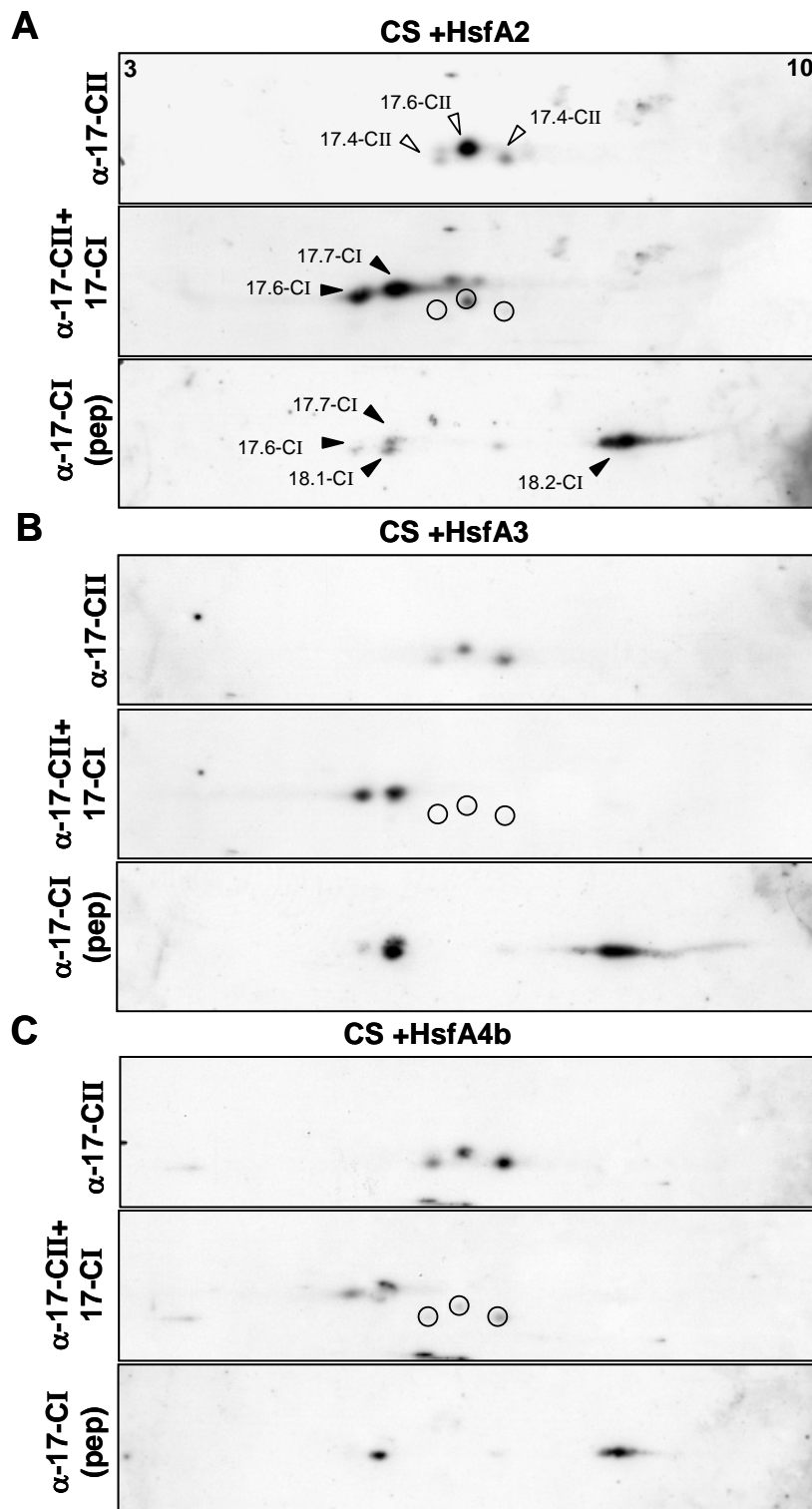
Tab. 2: Isoformen cytoplasmatischer sHsp der Klassen CI und CII.

Klasse	Protein (Aminosäurereste)	EST	MW (kDa)	IEP (pI)	Antikörper
<b>CI-(A)</b>	Hsp17.6-CI (154)	TC162620	17,63	5,42	<b><math>\alpha</math>-17-CI</b>
	Hsp17.7-CI (154)	TC163795	17,68	5,74	
	Hsp17.8-CI (154)	TC98618	17,77	5,74	
<b>CI-(B)</b>	Hsp18.1-CI (160)	TC155466	18,14	6,22	<b><math>\alpha</math>-17-CI (pep)</b>
	Hsp18.2-CI (160)	TC164285	18,24	9,54	
<b>CI-(C)</b>	Hsp15.6-CI (136)	EST586873	15,65	7,85	-
<b>CII</b>	Hsp17.4-CII (155)	TC157710	17,4	7,2	<b><math>\alpha</math>-17-CII</b>
	Hsp17.6-CII (155)	TC163406	17,6	6,4	

Die sechs Vertreter der Klasse CI können anhand von Sequenzvergleichen in drei Gruppen unterteilt werden (siehe auch Abb. 22 in der Diskussion). Sequenzinformationen sind im TIGR *tomato gene index* (<http://www.tigr.org/tdb/tgi/lgi>) unter den entsprechenden TC-Nummern erhältlich. Proteine der Gruppe A werden bevorzugt von dem Antikörper  $\alpha$ -17-CI erkannt, Proteine der Gruppe B dagegen von dem Antikörper  $\alpha$ -17-CI (pep). EST, *expressed sequence tag*; IEP, isoelektrischer Punkt; MW, Molekulargewicht; TC, *tentative consensus sequence*.

Anhand von EST-Daten konnten sechs Vertreter der Klasse CI identifiziert werden, von denen fünf mit den in unserer Arbeitsgruppe vorhandenen Antikörpern nachgewiesen werden konnten. Hsp15.6-CI wurde von diesen Antikörpern nicht erkannt. Weiterhin konnten zwei Vertreter der Klasse CII identifiziert werden. Die Positionen der einzelnen Vertreter im zweidimensionalen Gel wurden bestimmt, indem pflanzliche Expressionsvektoren konstruiert wurden, die deren transiente Expression in CS-Protoplasten und anschließende Auftrennung ermöglichten. Das Ergebnis ist in Abb. 25 im Anhang dargestellt. Durch Vergleich mit dem Hsf-induzierten Proteinmuster kleiner Hsp konnten einzelne Vertreter der Klassen CI und CII identifiziert werden (Abb. 9). Erleichtert wurde die Zuordnung durch Verwendung zweier verschiedener Antikörper gegen Proteine der Klasse CI, die unterschiedliche Spezifitäten aufweisen. Während der Antikörper  $\alpha$ -17-CI bevorzugt Vertreter der Gruppe A, d. h. Hsp17.6-CI, Hsp17.7-CI und Hsp17.8-CI erkennt, bindet  $\alpha$ -17-CI (pep) verstärkt an Vertreter der Gruppe B, d. h. an Hsp18.1-CI und Hsp18.2-CI. Tatsächlich zeigten sich Unterschiede im Expressionsmuster der sHsp:

- Alle drei Hsf induzierten die Bildung von Hsp17-CII (Abb. 9A, B und C, Detektion mit  $\alpha$ -17-CII). Hsp17.4-CII lag dabei offensichtlich in einer modifizierten und einer unmodifizierten Form vor. Die Position eines Teiles des Proteins war in den sauren pH-Bereich verschoben. Die Modifizierung fand sich auch bei transienter Expression von plasmidkodiertem Hsp17.4-CII (vergleiche Abb. 9 und Abb. 25 im Anhang). Während HsfA3 und HsfA4b (B, C) gleichermaßen die Expression von Hsp17.4-CII und Hsp17.6-CII induzierten, bewirkte HsfA2 (A) hauptsächlich die Synthese von Hsp17.6-CII.
- Betrachtet man die Expression von Vertretern von Hsp17-CI der Gruppe A (Abb. 9A, B und C, Detektion mit  $\alpha$ -17-CII+17-CI), erwiesen sich HsfA2 und HsfA3 (A, B) weitaus effektiver als HsfA4b (C).
- Die Bildung von Hsp18.1-CI wurde sowohl durch HsfA2, HsfA3 und HsfA4b induziert (Abb. 9A, B und C, Detektion mit  $\alpha$ -17-CI (pep)), ist jedoch am stärksten in Protoplasten, die mit pRTHsfA3 transformiert wurden (B); Auch die Expression von Hsp18.2-CI wurde durch alle drei Hsf induziert, hier allerdings erwiesen sich HsfA2 und HsfA3 (A, B) als am effektivsten.



**Abb. 9: Analyse der Hsf-induzierten Expression von sHsp der Klassen CI und CII mittels zwei-dimensionaler Gelelektrophorese.**

Protoplasten aus CS-Pflanzen wurden mit pRTHsfA2 (A), pRTHsfA3 (B), und pRTdSHsfA4b-HA (C) transformiert. Nach Inkubation über Nacht bei 25°C wurden die Proben geerntet und Proteinextrakte hergestellt, die mittels zwei-dimensionale Gelelektrophorese und anschließender Immunoblot-Analyse untersucht wurden. Die verwendeten Antiseren sind am Rand angegeben. Die Positionen von Vertretern der Klasse CII sind mit offenen Pfeilen, die Positionen von Vertretern der Klasse CI mit geschlossenen Pfeilen markiert.

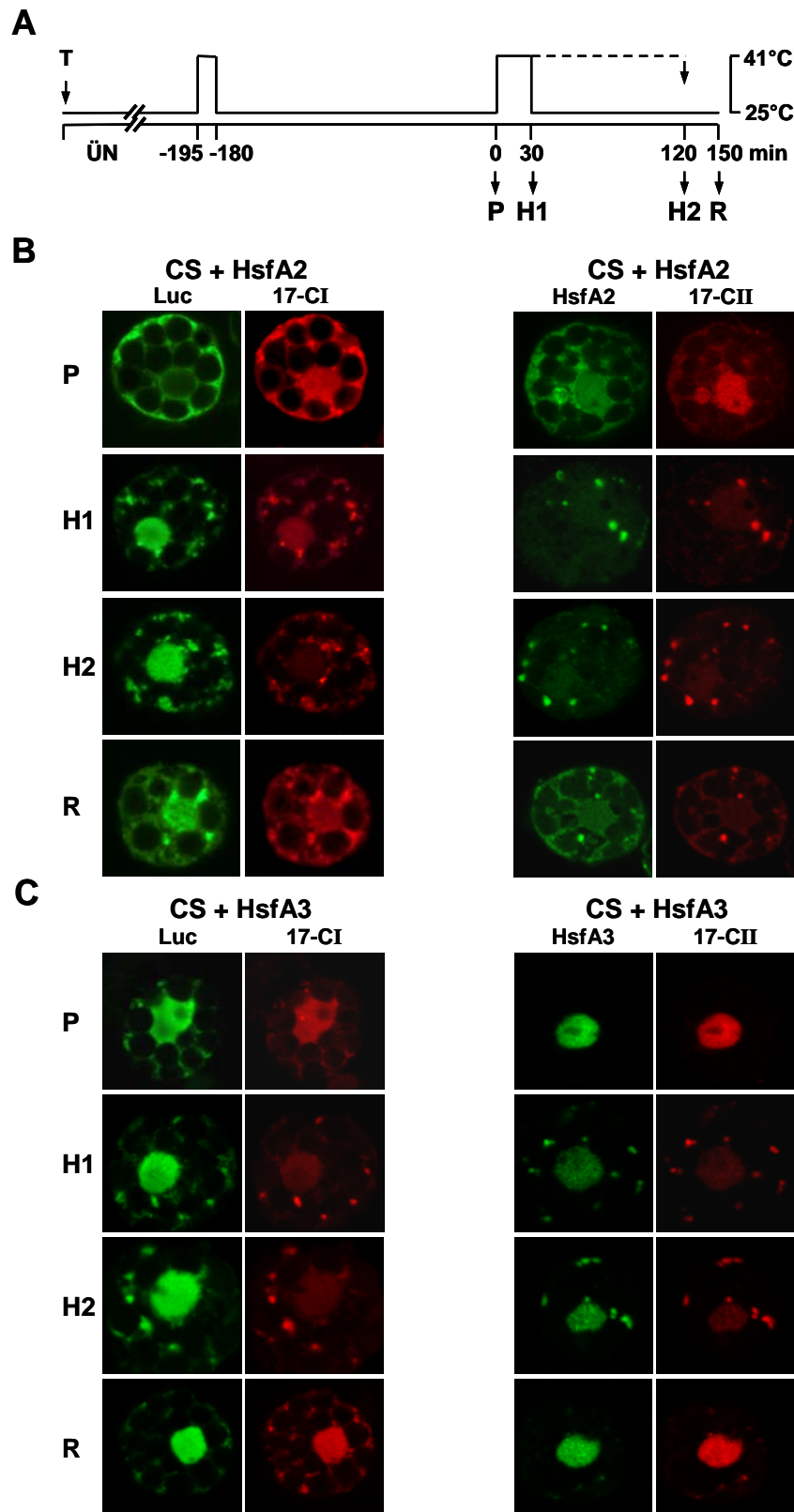
Eine Zusammenfassung der in Abb. 8 und Abb. 9 dargestellten Ergebnisse findet sich in Tab. 3.

**Tab. 3: Zusammenfassung der Daten zur Hsf-induzierten Expression von Hsp**

	HsfA2	HsfA3	HsfA4b	P		
	CS				WT	
<b>17.6-CI</b>	+++	++	(+)	n.a.	n.a.	2-D-Analyse
<b>17.7-CI/17.8-CI</b>	+++	++	+	n.a.	n.a.	
<b>18.1-CI</b>	(+)	+++	+	n.a.	n.a.	
<b>18.2-CI</b>	+++	+++	+	n.a.	n.a.	
<b>17.4-CII</b>	+	+	++	n.a.	n.a.	
<b>17.6-CII</b>	++	+	+	n.a.	n.a.	
<b>70-2</b>	+	+	+	+	+	RT-PCR
<b>70-4</b>	++	++	++	++	++	
<b>70-1</b>	(+)	(+)	(+)	++	++	
<b>70-3</b>	(+)	(+)	(+)	+	+	
<b>70-5</b>	-	(+)	+	-	++	
<b>70-6</b>	++	+	(+)	-	++	
<b>101</b>	+	++	+	(+)	+++	

In der Tabelle sind die Ergebnisse aus Abb. 8 und Abb. 9 zusammenfassend dargestellt. Die Intensitäten der Banden in der RT-PCR-Analyse bzw. der Signale in der Immunoblot-Analyse wurden verglichen und werden durch die Anzahl der „+“ angezeigt. - = keine Expression; (+) = schwache Expression; +++ = sehr starke Expression. n.a., nicht analysiert.

Durch die transiente Expression von Hsf in CS-Protoplasten kann also die infolge der Cosuppression von HsfA1 fehlende Synthese wichtiger Komponenten des endogenen Chaperonsystems wieder stattfinden. Dies bewirkt eine zumindest teilweise Wiederherstellung der Protektion von Luciferase nach einem Hitzestress. Es bleibt die Frage, ob diese Wiederherstellung des thermotoleranten Zustandes mit der Bildung von HSG-Komplexen verbunden ist. Zur Beantwortung dieser Frage wurden in CS-Protoplasten HsfA2 oder HsfA3 mit Luciferase coexprimiert. Die Auswirkung einer Expression von HsfA4b wurde in diesem Versuchsteil nicht analysiert.



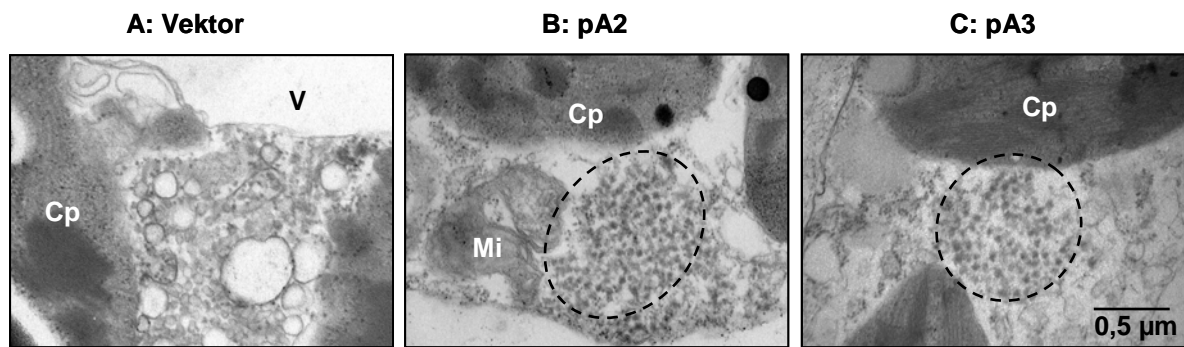
**Abb. 10: Intrazelluläre Lokalisation von Luciferase, HsfA2, HsfA3, Hsp17-CI und -CII.**

Details über die Transformation und das HS-Regime sind im Piktogramm in (A) dargestellt und wurden in der Legende zu Abb. 5 bereits genauer erläutert. CS-Protoplasten wurden mit Luciferase- und HsfA2- bzw. HsfA3-Expressionsplasmiden transformiert (B, C). Luciferase (Luc) und HsfA2 bzw. HsfA3 wurden im grünen, Hsp17-CI und Hsp17-CII im roten Kanal nachgewiesen.

Über indirekte Immunfluoreszenz wurde die Lokalisierung von Luciferase, Hsp17-CI und Hsp17-CII sowie des betreffenden Hsf untersucht. In Protoplasten, die mit dem für HsfA2 kodierenden Expressionsplasmid transformiert wurden kam es im Verlauf der Hitzestressbehandlung zur einer reversiblen Assoziation von Hsp17-CI, Hsp17-CII und Luciferase in cytoplasmatischen HSG-Komplexen, die von denen in Zellen aus WT-Pflanzen beobachteten nicht zu unterscheiden waren (vergleiche Abb. 10B und Abb. 5). Auch HsfA2 wurde in die HSG-Komplexe inkorporiert und in der Erholungsphase nach dem Hitzestress aus diesen wieder freigesetzt. Die Expression von HsfA3 führte ebenfalls zur Bildung aller Komponenten, die für die Entstehung von HSG-Komplexen essentiell sind, und zum Einbau der Luciferase (Abb. 10C). Die Bildung der HSG-Komplexe und der Einbau der Luciferase in diese korreliert also mit der Protektion der Luciferase. Interessanterweise wurde auch HsfA3 nach Hitzestress in die HSG-Komplexe eingebaut, eine Tatsache, die im Widerspruch zu früheren Beobachtungen in *Lycopersicon peruvianum*-Zellkultur steht (Bharti et al., 2000). Eine Bestätigung dieses Ergebnisses mit Hilfe von Immunogold-Markierung und einer elektronenmikroskopischen Untersuchung steht allerdings noch aus.

Mittels Immunfluoreszenz konnte nicht die Frage beantwortet werden, ob nach Transformation mit pRTHsfA2 bzw. pRTHsfA3 wirklich alle Proteine gebildet werden, die für die Assemblierung der typischen 40 nm-Partikel nötig sind, die für pflanzliche HSG-Komplexe charakteristisch sind. Daher wurde die Ultrastruktur der Protoplasten untersucht (Abb. 11). Nach einer Hitzestressbehandlung waren die 40 nm-Partikel der HSG-Komplexe in CS-Protoplasten nur nach Transformation mit pRTHsfA2 bzw. pRTHsfA3 nachweisbar. Sie waren in der Ultrastruktur identisch mit den HSG-Komplexen, die nach Hitzestress in WT-Protoplasten auftraten (Vergleiche Abb. 11 und Abb. 6).





**Abb. 11: Wiederherstellung von HSG-Komplexen in CS-Protoplasten durch Transformation mit pRTHsfA2 oder pRTHsfA3.**

CS-Protoplasten wurden mit leerem Vektor (A) bzw. mit pRTHsfA2 (B) oder pRTHsfA3 (C) transformiert. Nach Inkubation über Nacht wurden sie für 15 min bei 40°C präinduziert. Nach 3 h Kultivierung bei 25°C wurden sie einem zweiten HS für 2 h bei 41°C unterzogen (siehe auch Piktogramm in Abb. 10, Probe H2). Cp, Chloroplast; Mi, Mitochondrium; Nu, Nukleus; V, Vakuole. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 0,5 µm. HSG-Komplexe sind mit einer gestrichelten Linie markiert. Die Abbildung entstand in Zusammenarbeit mit Christian Weber und Sybille Winkelhaus.

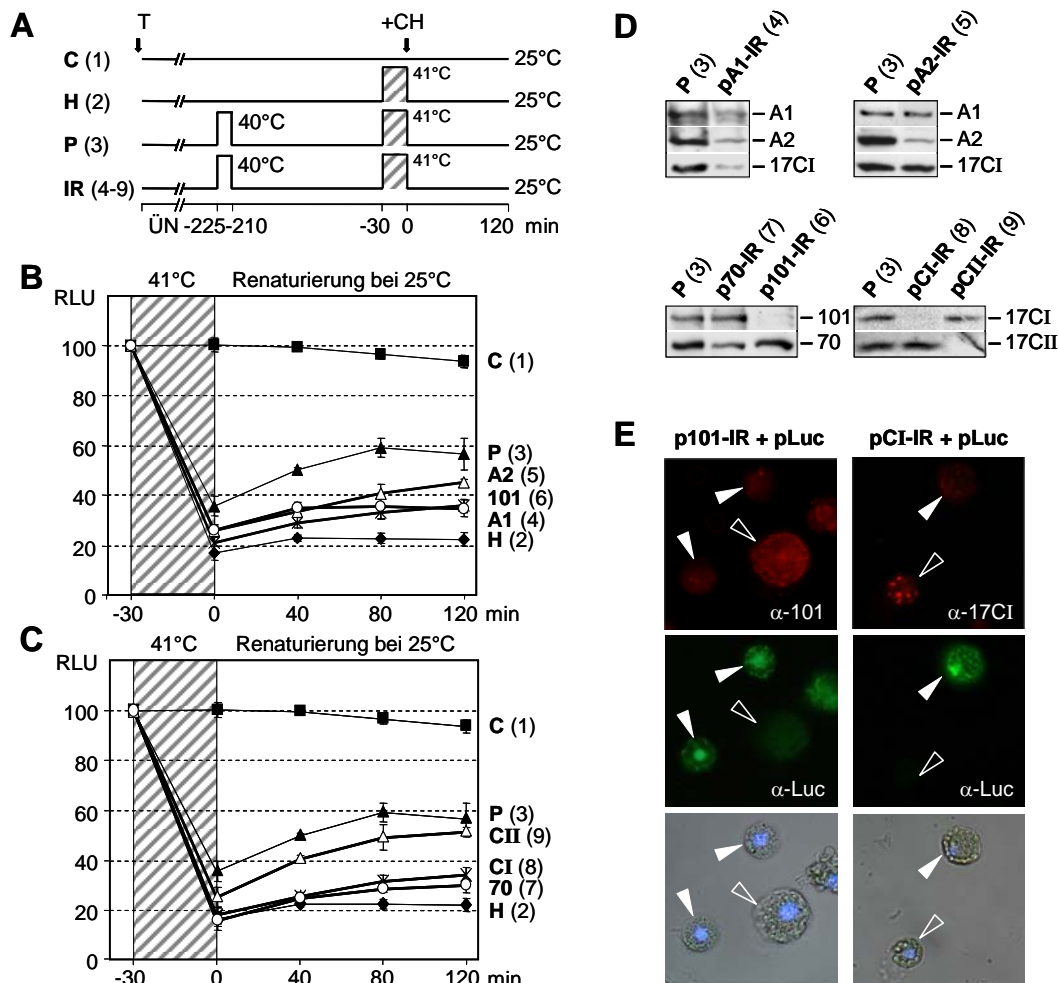
### 3.3 Funktion von sHsp, Hsp70 und Hsp101 in der Ausprägung von Thermotoleranz

Aktuellen Modellen zufolge beschränkt sich die Chaperonfunktion von sHsp auf die Bindung denaturierender Proteine. Viele Studien belegen die Fähigkeit von sHsp, auf diese Weise deren irreversible Aggregation in einem ATP-unabhängigen Mechanismus zu verhindern (Waters et al., 1996; Ehrnsperger et al., 1997; Lee et al., 1997; Kim et al., 2003). Gleichzeitig ermöglichen sie die ATP-abhängige Rückfaltung durch andere Chaperone. Hierbei spielt das Hsp70-System eine besondere Rolle (Forreiter et al., 1997; Lee and Vierling, 2000).

Im folgenden Abschnitt befasse ich mich mit der Funktion einzelner Komponenten des pflanzlichen Chaperonnetzwerkes, die eine Rolle in der Hitzestressantwort und der Ausprägung induzierter Thermotoleranz spielen. Die Untersuchung der Chaperonfunktion dieser Komponenten erfolgte dabei durch (1) den transienten *knock-down* ihrer Expression in WT-Protoplasten unter Verwendung pflanzlicher Expressionsvektoren, die *inverted repeats* (IR) von cDNA-Fragmenten enthalten sowie durch (2) eine transiente Überexpression der betreffenden Proteine in CS-Protoplasten. Dabei wurde der Einfluss von Hsp101, sowie einzelner Isoformen von sHsp der Klassen CI und CII, und der Hsp70-Familie auf die hitzestressinduzierte Denaturierung der Luciferase bzw. deren Rückfaltung und Renaturierung während einer anschließenden Erholungsphase untersucht.

#### 3.3.1 Analyse der Funktion einzelner Komponenten des Chaperonnetzwerkes mittels RNAi

Zum transienten *knock-down* der Expression von HsfA1, HsfA2 sowie der Chaperonfamilien Hsp101, Hsp70, Hsp17-CI und Hsp17-CII wurden RNAi-Vektoren konstruiert. Für den *knock-down* der Expression ganzer Chaperonfamilien wurden entweder Konstrukte verwendet, die hochkonservierte Teile der kodierenden Region der entsprechenden Gene enthalten, oder, im Falle des *knock-down* von Hsp17-CI, eine Mischung aus IR-Konstrukten, die für Hsp17.6-CI, Hsp17.8-CI und Hsp18.1-CI kodieren. Dies war erforderlich, da die Sequenzähnlichkeit der für Klasse CI-sHsp kodierenden mRNA nicht groß genug ist, einen *knock-down* der Expression aller Isoformen zu gewährleisten.



**Abb. 12: Knock-down der Expression von Hsf und Hsp in WT-Tomatenmesophyllprotoplasten.**

WT-Protoplasten wurden mit Expressionsvektoren transformiert, die *inverted repeats* (IR) von cDNA-Fragmenten enthalten, die für HsfA1 (4) oder HsfA2 (5), bzw. Hsp101 (6), Hsp70 (7), Hsp17-CI (8), oder Hsp17-CII (9) kodieren. Alle Proben wurden gleichzeitig mit einem für Luciferase kodierenden Expressionsplasmid (pLuc) kotransformiert. Nach Inkubation über Nacht (ÜN) wurden die Protoplasten einer Hitzestressbehandlung unterzogen, die im Piktogramm in (A) dargestellt ist. Kontrollproben (1) wurden bei 25°C gehalten; Die Probe 3, sowie die Proben 4-9 wurden für 15 min bei 40°C präinduziert, gefolgt von einer dreistündigen Inkubation bei 25°C. Die Probe 2 wurde nicht präinduziert. Zur Denaturierung der Luciferase wurden die Proben 2-9 für 30 min einem Hitzestress bei 41°C unterzogen und daraufhin zur Renaturierung für 120 min bei 25°C inkubiert. Cycloheximid (CH, 10 µg/µl) wurde allen Proben zu Beginn der Renaturierungsphase zugegeben. (B, C) Luciferaseaktivitäten in relativen Lichteinheiten (RLU), die in % bezogen auf die Aktivität vor der Denaturierung (=100 %) angegeben sind. (D) Immunoblot-Analyse der zugehörigen Protoplastenextrakte. Die verwendeten Antiseren sind rechts angegeben. (E) Immunfluoreszenz-Analyse der RNAi-Effekte am Beispiel von Hsp101 und Hsp17-CI. Transformierte Protoplasten sind mit geschlossenen Pfeilen, nicht transformierte mit offenen Pfeilen markiert. Die Abbildung entstand in Zusammenarbeit mit Shravan Kumar Mishra.

Mesophyllprotoplasten aus WT-Tomatenpflanzen wurden mit Luciferase-Expressionsplasmid und den betreffenden RNAi-Vektoren transformiert (siehe Piktogramm in Abb. 12A). Nach Inkubation über Nacht wurden die Proben 3-9 für 15 min bei 40°C präinduziert, gefolgt von einer Erholungsphase von 3 h zur Expression endogener Chaperone.

Zum Nachweis der Selektivität der RNAi-Effekte wurde die Proteinexpression der Hsp und Hsf mittels Immunoblot-Analyse nachgewiesen (Abb. 12D). Es zeigte sich, dass nach Transformation mit den IR-Konstrukten ein spezifischer *knock-down* der Expression der entsprechenden Proteinfamilie erfolgte. Was konstitutiv exprimierte Proteine wie Hsc70 oder HsfA1 betraf (4 und 7), so war das Ausmaß der Reduktion natürlich von der Stabilität des Proteins abhängig. Insbesondere die Reduktion der Proteinmenge von Hsp/Hsc70 war geringer ausgeprägt als die hitzestressinduzierbarer Proteine. Der *knock-down* von HsfA1 führte zu einer Reduktion der Expression hitzestressinduzierter Proteine wie HsfA2 und Hsp17-CI (4).

Die in Abb. 12E dargestellte Immunfluoreszenzanalyse zeigt, dass alle Protoplasten, die Luciferase exprimierten, mit RNAi-Vektoren kotransformiert waren, d.h. auch RNAi-Effekte zeigten, ein Befund, der die Verlässlichkeit der in Abb. 12A und B dargestellten Ergebnisse unterstützt. Es wurde also nur die Immunoblot-Analyse, nicht aber die Luciferasemessung von der nicht reduzierten Synthese von Chaperonen in untransformierten Zellen beeinflusst. Insgesamt konnte eine Transformationseffizienz von etwa 50-60 % beobachtet werden (nicht gezeigt).

Die Thermotoleranz der Protoplasten wurde analysiert, indem diese, wie bereits in Abschnitt 3.1.1 und 3.2 beschrieben, einem Hitzestress für 30 min bei 41°C unterzogen wurden, und die Denaturierung der Luciferase sowie ihre Renaturierung in einer zweistündigen Renaturierungsphase nach dem Hitzestress untersucht wurde (Abb. 12B und C).

Die Luciferaseaktivität der Kontrollprobe 1, die keiner Hitzestressbehandlung ausgesetzt wurde, blieb während der gesamten Zeitdauer der Messung praktisch unverändert. In Probe 2 dagegen führte die Hitzestressbehandlung (30 min 41°C) zu einer dramatischen Verringerung der Enzymaktivität auf etwa 17 % des Ausgangswertes. Weiterhin fand praktisch keine Renaturierung in den darauf folgenden

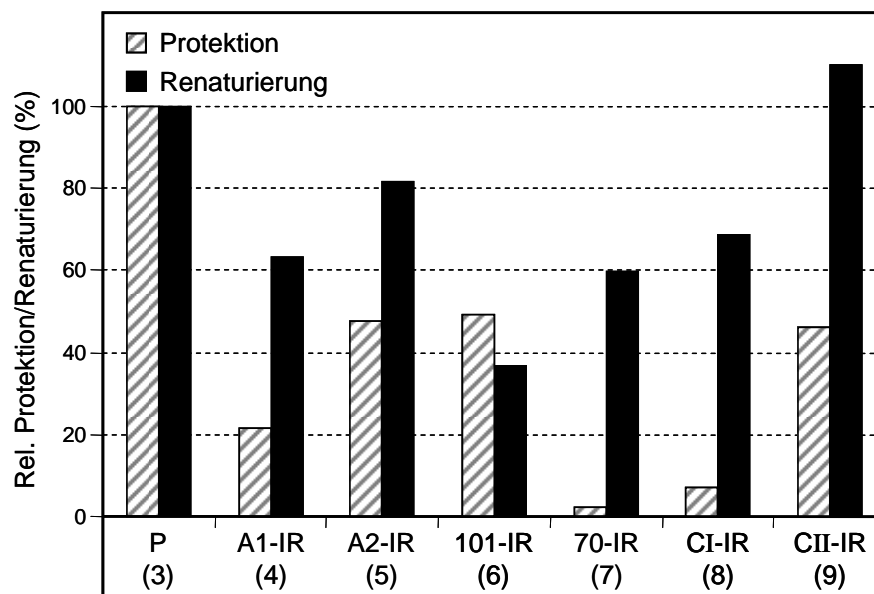
120 min statt. In der präinduzierten Probe 3 war die Luciferase infolge der Gegenwart endogener Chaperone teilweise vor Denaturierung geschützt, und es kam zu einer effizienten Renaturierung (38 bzw. 60 %).

- Der *knock-down* des konstitutiv exprimierten HsfA1 (Probe 4) bewirkte eine sichtbare Abnahme der Proteinmenge nicht nur von HsfA1, sondern auch von den hitzestressinduzierbaren Proteinen HsfA2 und Hsp17-CI (Abb. 12D). Dies resultierte in einer starken Abnahme der Protektion der Luciferase, und in einer moderaten Abnahme der Renaturierung.
- Das fast vollständige Ausschalten der Expression von HsfA2 (Probe 5) hatte nur einen schwachen Effekt: Anscheinend war die Gegenwart von HsfA1 ausreichend, die Expression von Chaperonen und den thermotoleranten Zustand aufrechtzuerhalten.

Die Effekte des *knock-down* verschiedener Hsp-Familien waren unterschiedlich:

- Eine Abnahme der Expression der hitzestressinduzierbaren Form von Hsp101 bewirkte eine moderate Reduktion der Protektion der Luciferase und verringerte die Renaturierung stark (Probe 6).
- Am dramatischsten war der Effekt auf die Protektion der Luciferase bei Verwendung des Vektors, der einen *inverted repeat* der für Hsp70 kodierenden cDNA enthält. Die Renaturierung dagegen wurde nur moderat beeinflusst (Probe 7). Der dramatische Effekt des *knock-down* in der Luciferasemessung korrespondiert nicht mit den nur sehr moderaten Änderungen der Expression von Hsp70, wie sie in der Immunoblot-Analyse nachgewiesen werden konnte (Abb. 12D).
- Der *knock-down* der Expression von Hsp17-CI hatte ähnliche Auswirkungen: Hauptsächlich wurde die Protektion der Luciferase beeinträchtigt, die Renaturierung dagegen wurde kaum beeinflusst (Probe 8).
- Der geringste Effekt wurde bei einem *knock-down* der Expression von Hsp17-CII beobachtet (Probe 9): Der Einfluss auf die Protektion war moderat, die Renaturierung der Luciferase blieb unbeeinflusst.

Um die Auswirkung des *knock-down* der Hsp und Hsf auf die Thermotoleranz der Protoplasten besser beurteilen und übersichtlicher darstellen zu können, wurden die mit RNAi-Konstrukten transformierten Proben (4-9) mit den Proben 2 und 3 verglichen: Probe 2 repräsentiert den nicht präinduzierten, nicht thermotoleranten Zustand, während die präinduzierte, thermotolerante Probe 3 das gesamte Spektrum endogener Chaperone enthält. Die Differenz der relativen Luciferaseaktivitäten, die in Probe 2 und 3 am Ende der Denaturierungsphase gemessen wurden, wurden gleich 100 % gesetzt (Protektion in Abb. 13, Probe 3). Ebenso wurde die Differenz zwischen den für Probe 3 gemessenen relativen Luciferaseaktivitäten am Ende der Denaturierungsphase und am Ende der Renaturierungsphase gleich 100 % gesetzt (Renaturierung in Abb. 13, Probe 3). Die entsprechenden Werte der Proben 4-9 wurden darauf bezogen:

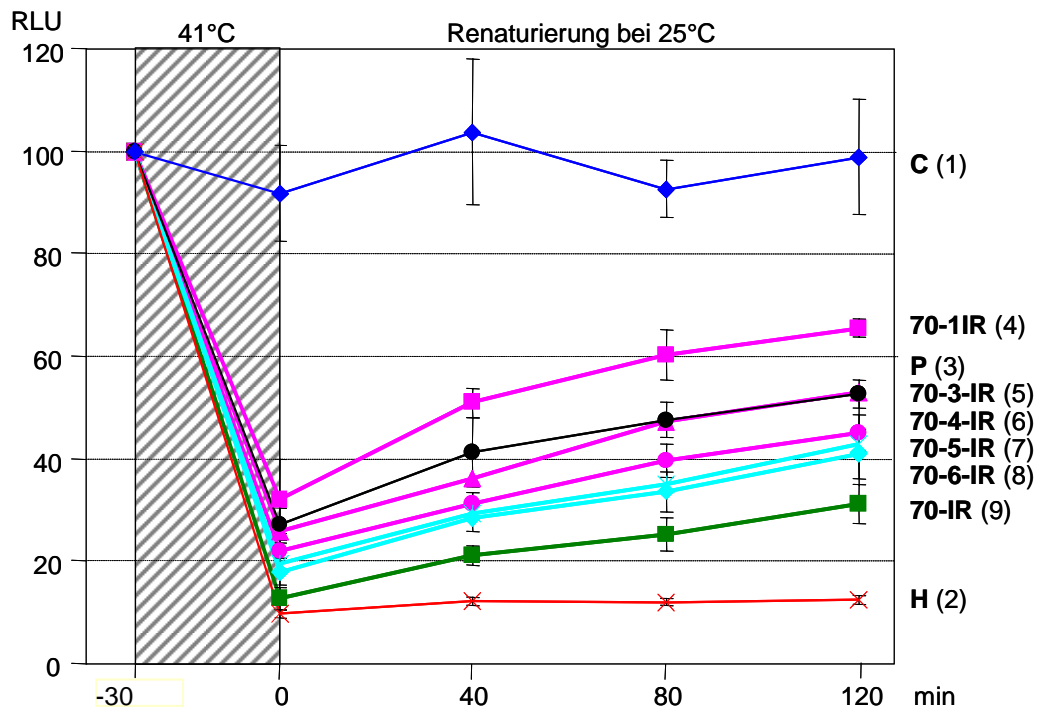
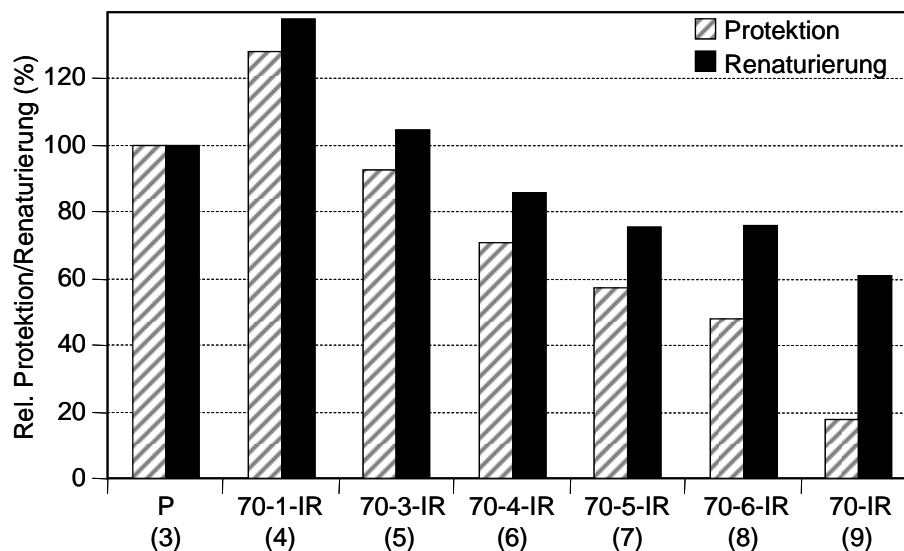


**Abb. 13: RNAi-Effekte auf Protektion und Renaturierung der Luciferase.**

Zur vereinfachten Darstellung der in Abb. 12 gezeigten Ergebnisse wurde die Differenz der relativen Luciferaseaktivitäten, die in Probe H (2) und Probe P (3) am Ende der Denaturierungsphase gemessen wurden, gleich 100 % gesetzt, und die korrespondierenden Werte der Proben 4-9 darauf bezogen (Protektion). Ebenso wurde die Differenz zwischen den für Probe 3 gemessenen relativen Luciferaseaktivitäten am Ende der Denaturierungsphase und am Ende der Renaturierungsphase gleich 100 % gesetzt (Renaturierung), und die Werte der Proben 4-9 dazu in Bezug gesetzt.

In EST-Datenbanken der Tomate existieren sechs cytoplasmatische Vertreter der Hsp70-Familie. Diese können mit in unserer Arbeitsgruppe vorhandenen und ebenso mit käuflich erwerbbaaren Antikörpern nicht unterschieden werden. Die Expression der einzelnen Hsp70-Gene konnte jedoch auf RNA-Ebene in WT- und CS-Protoplasten über RT-PCR unter Verwendung genspezifischer Primer nachgewiesen werden (siehe Abb. 8). Konstrukte mit inverted repeats zum spezifischen knock-down der Expression dieser einzelnen Vertreter wurden in der Luciferasemessung getestet (Abb. 14). Zur Herstellung der RNAi-Vektoren wurde das 3'-Ende der für Hsp 70-1, -3, -4, 5- und -6 kodierenden Region sowie Teile der 3'-UTR verwendet (siehe auch Abb. 24 im Anhang).

Überraschenderweise konnte eine ausgeprägte Reduktion in Protektion und Renaturierung der Luciferase nur nach knock-down von Hsp70-4, -5 und -6 (Proben 6, 7 und 8) beobachtet werden. Bei Hsp70-5 und -6 handelt es sich um die beiden klar hitzestressinduzierten Isoformen der Hsp70-Familie, deren Expression HsfA1-abhängig ist (siehe Abb. 8B). Die Effekte waren dennoch verglichen mit dem Effekt des inverted repeat-Konstruktes gegen die gesamte Hsp70-Familie (Probe 9) geringer. Dieses ist gegen den Sequenzbereich gerichtet, der für die konservierte, N-terminale Region von Hsp70 kodiert.

**A****B**

**Abb. 14: Knock-down der Expression cytoplasmatischer Isoformen der Hsp70-Familie.**

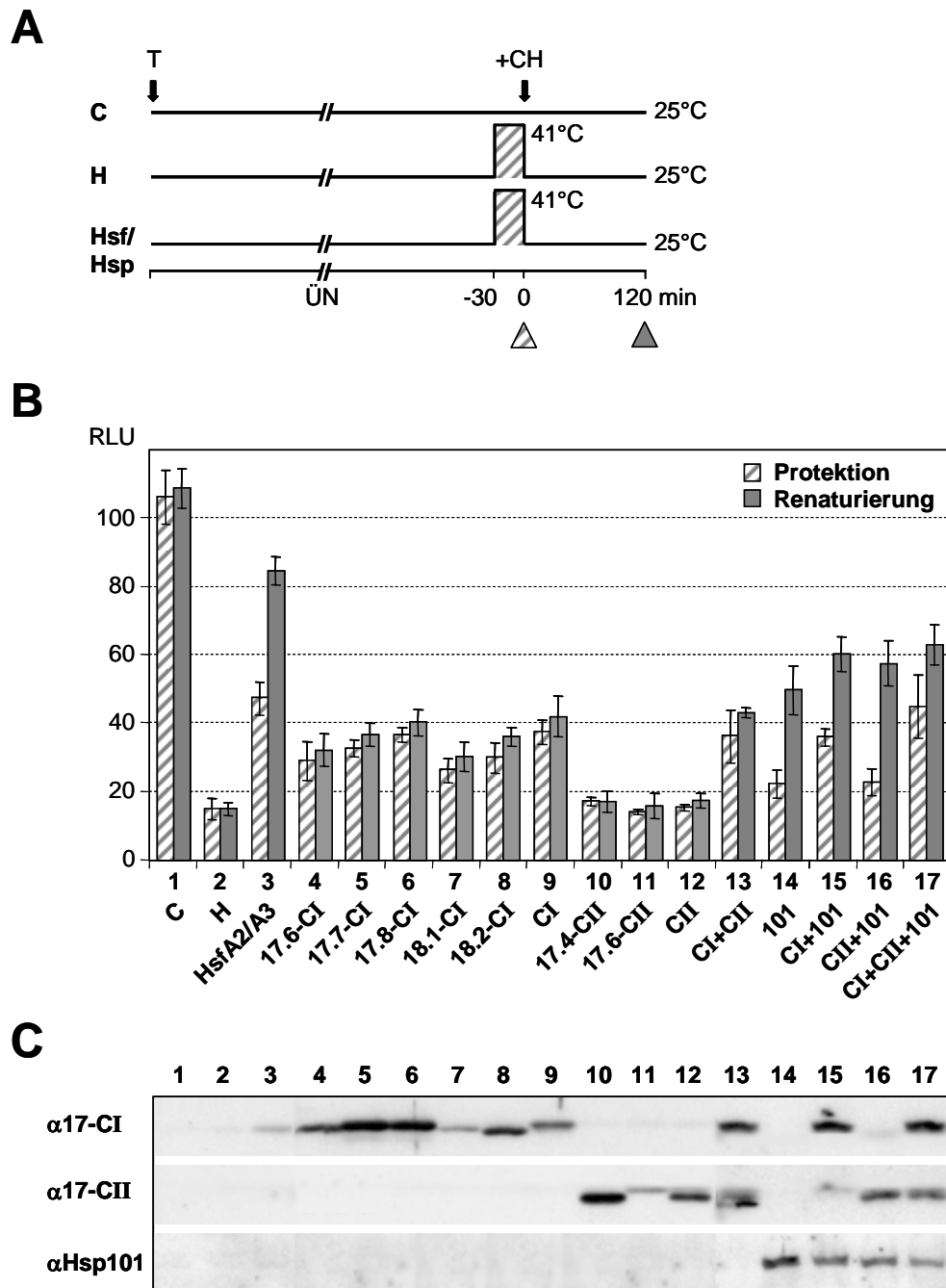
WT-Mesophyllprotoplasten wurden mit *inverted repeat* (IR)-Konstrukten transformiert, die den spezifischen *knock-down* von fünf Isoformen der Hsp70-Familie ermöglichten (4-8). Die Verwendung eines Hsp70-IR führt zu einem generellen *knock-down* aller Vertreter der Hsp70-Familie (9). (A) Zur Transformation und Hitzestressbehandlung der Protoplasten sowie zur Messung der Luciferaseaktivität siehe Legende zu Abb. 12. (B) Der prozentuale Anteil der bei Transformation der IR-Konstrukte ermittelten Werte für Protektion und Renaturierung bezogen auf die für präinduzierte Protoplasten (P) ermittelten Werte (=100%) wurde wie in der Legende zu Abb. 13 beschrieben errechnet. Die Abbildung entstand in Zusammenarbeit mit Shravan Kumar Mishra.



Wenn man die in Abb. 12-Abb. 14 beschriebenen, dominanten Effekte zusammenfasst, lässt sich Folgendes festhalten: Die Protektion der Luciferase ist abhängig von der Gegenwart von Hsp70, wobei die hitzestressinduzierbaren, HsfA1-abhängigen Isoformen eine besondere Rolle spielen, sowie von Hsp17-CI. Hsp17-CII hat im Vergleich zu Hsp17-CI einen geringen Effekt auf die Protektion der Luciferase. Die Renaturierung erfordert hauptsächlich die Gegenwart von Hsp101, allerdings spielen auch Hsp70 und Hsp17-CI eine Rolle.

### **3.3.2 Wiederherstellung von Thermotoleranz durch transiente Expression von Chaperonen: ein synthetischer Ansatz**

In den folgenden Experimenten wurde wiederum die Funktion verschiedener Chaperone mit Hilfe des Reporterproteins Luciferase untersucht. Es wurde allerdings ein anderer experimenteller Ansatz als der in Abschnitt 3.3.1 beschriebene angewendet: Während dort die Expression von Hsp in WT-Protoplasten selektiv unterdrückt wurde, wird in diesem Abschnitt der Effekt einer Überexpression von Hsp analysiert. Um einen Einfluss des endogenen Chaperonsystems auszuschließen, wurden CS-Protoplasten verwendet. Das Piktogramm in Abb. 15A beschreibt die experimentelle Vorgehensweise: Die Protoplasten wurden mit Luciferase-Expressionsplasmid sowie leerem Vektor (C, H) oder wie angegeben mit den für Hsp oder Hsf kodierenden Expressionvektoren transformiert. Zur vereinfachenden Darstellung der Ergebnisse sind in Abb. 15 nur die Luciferaseaktivitäten, die am Ende der Denaturierungs- (Protektion) oder Renaturierungsphase (Renaturierung) gemessen wurden, gezeigt. Diese sind in RLU als prozentualer Anteil an der Aktivität vor der Denaturierungsphase angegeben.



**Abb. 15: Einfluss der Expression von Hsp auf Protektion und Renaturierung von Luciferase.**

CS-Protoplasten wurden zur Expression der in der Abbildung angegebenen Hsf und Hsp mit den entsprechenden Expressionsplasmiden, sowie mit Luciferase-Expressionsplasmid kotransformiert. (A) Zur Probenbehandlung und zur Messung der Luciferaseaktivität siehe Legende zu Abb. 4 und Abb. 7. (B) Die in den Säulendiagrammen dargestellten Werte basieren auf der Luciferaseaktivität in relativen Lichteinheiten (RLU), die in % bezogen auf die Aktivität vor der Denaturierung (=100 %) angegeben ist. Zur Vereinfachung sind nur die direkt nach der Denaturierungsphase (Protektion) sowie die nach der zweistündigen Renaturierungsphase (Renaturierung) gemessenen Werte dargestellt (siehe Pfeile in A). (C) Immunoblot-Analyse der zugehörigen Proben. Die detektierten Proteine sind am Rand angegeben.

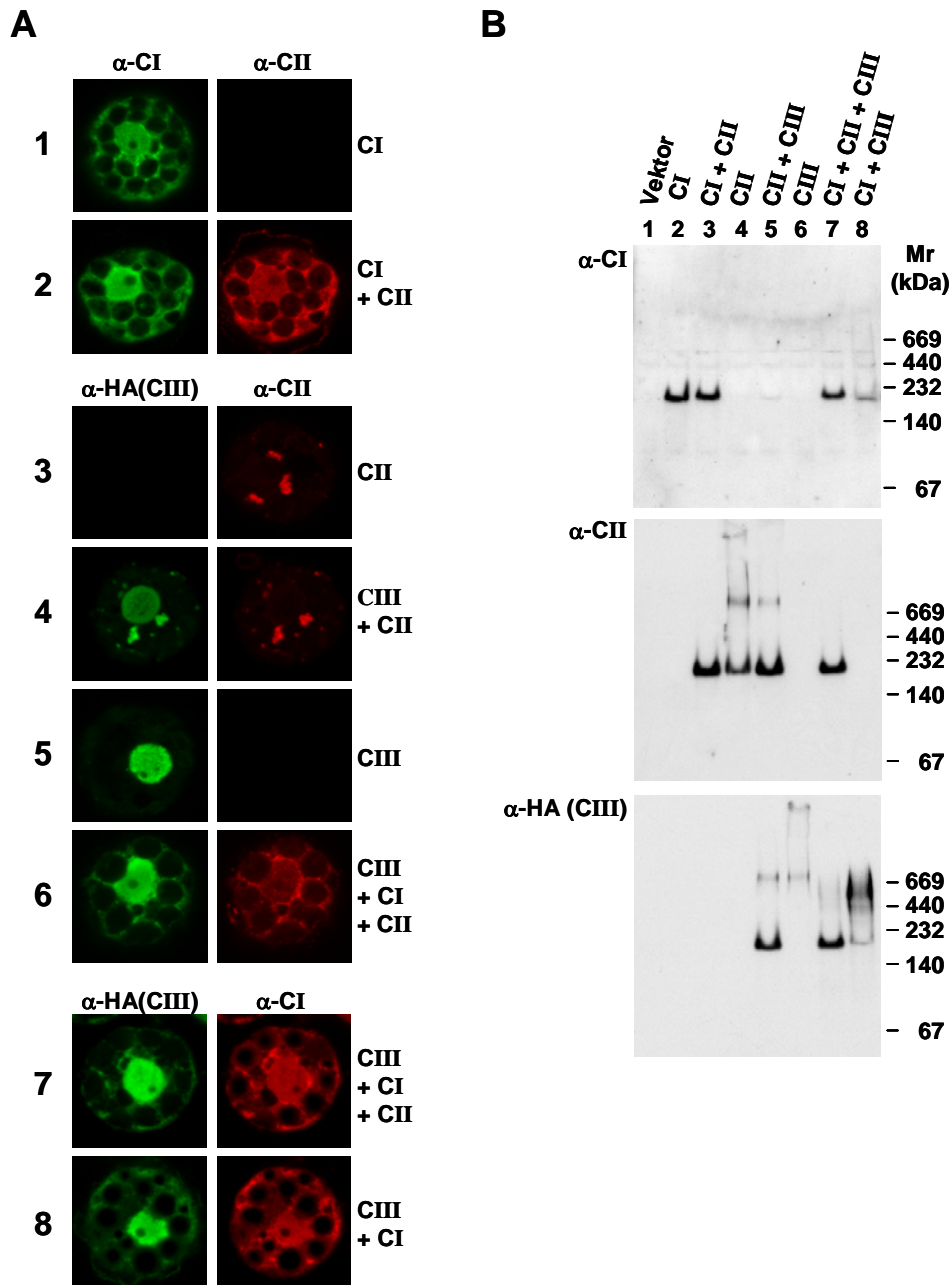
Die in den einzelnen Proben beobachteten Effekte müssen im Vergleich zu der nicht thermotoleranten Probe H diskutiert werden, die nach der Denaturierungsphase eine Luciferaseaktivität von 15-18 % der Aktivität vor dem Hitzestress, und keine nachweisbare Renaturierung aufweist (Probe 2 in Abb. 15B). In einer weiteren Vergleichsprobe wurde durch Kotransformation mit pRTHsfA2 und pRTHsfA3 ein thermotoleranter Zustand erzeugt (Probe 3 in Abb. 15B). Diese beiden Hsf induzieren, wie bereits in Abb. 8 dargestellt wurde, die Synthese von Chaperonen in CS-Protoplasten. Die Protektion der Luciferase in dieser Probe beträgt 42-50 % am Ende der Denaturierungsphase, und erreicht etwa 80 % in der Erholungsphase nach der Denaturierung. Zunächst wurde der Effekt der Expression verschiedener Isoformen getestet, die zu den cytoplasmatischen Klassen CI und CII aus *Lycopersicon esculentum* gehören (Abb. 15B). Nähere Informationen zu den genannten Proteinen finden sich in Tab. 2. Die fünf Isoformen, die zur Klasse CI gehören, zeigten einen deutlichen schützenden Effekt (Proben 4-8), der durch eine Kombination dieser Isoformen nicht signifikant gesteigert werden konnte (Probe 9). Eine Renaturierung konnte in Gegenwart der Isoformen der Klasse CI nicht beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigte die Expression der beiden Klasse CII-Isoformen allein (Proben 10 und 11) sowie in Kombination (Probe 12) keinen Effekt. Weiterhin wurden Kombinationen verschiedener Chaperone getestet. Dabei zeigte sich, dass die Expression von *Arabidopsis thaliana* Hsp101 zwar keinen Effekt auf die Protektion der Luciferase hat, dafür aber deren Renaturierung stark verbessert (Probe 14). Die Kombination von Hsp17-CI mit Hsp101 führte sowohl zu einer gesteigerten Protektion der Luciferase nach einem Hitzestress, als auch zu einer Verbesserung der Renaturierung (Probe 15). Eine Kombination mit Hsp17-CII bewirkte nur eine geringfügige Verbesserung (Proben 13, 16 und 17). Die Expression eines konstitutiven und eines hitzestressinduzierten Vertreters der Hsp70-Familie aus *Lycopersicon peruvianum*, die LeHsp70-3 und LeHsp70-5 homolog sind, ergab weder eine Verbesserung der Protektion noch der Renaturierung. Auch deren Mischung oder die Kombination mit CI-sHsp oder Hsp101 hatte keinen Effekt (Daten nicht gezeigt).

### **3.4 Interaktionen cytoplasmatischer sHsp**

Wie bereits in der Einleitung ausgeführt wurde, ist eine wichtige Eigenschaft pflanzlicher sHsp die Fähigkeit, klassenspezifische homooligomere Komplexe zu bilden, die meist aus 12 Untereinheiten aufgebaut sind (Lee et al., 1995, 1997; Kirschner et al., 2000; van Montfort et al., 2001). Im Hefe-Zwei-Hybrid-System zeigen sHsps im Allgemeinen ebenfalls nur klassenspezifische Interaktionen: Klasse CI- und CII-Proteine interagieren nur mit Proteinen derselben Klasse, allerdings auch mit Vertretern anderer Spezies (Kirschner et al., 2000). Das Hefe-Zwei-Hybrid-System weist allerdings Besonderheiten auf, die es unmöglich machen, Interaktionen von sHsp in ihrem nativen, oligomeren Zustand darzustellen. Die Klasse CIII weist besondere Eigenschaften auf: LpHsp16.1-CIII wurde mittels des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems als Interaktionspartner von Hsp18.1-CI aus Erbse identifiziert (Siddique et al., 2003). In weiteren Interaktionsstudien erwies sich, dass Hsp 16.1-CIII in der Lage ist, sowohl mit Mitgliedern der Klasse CI, als auch der Klasse CII zu interagieren.

#### **3.4.1 Interaktionen cytoplasmatischer sHsp der Klassen CI, CII und CIII**

In diesem Abschnitt sind Ergebnisse zur Untersuchung der Interaktionen von Proteinen der cytoplasmatischen Klassen CI, CII und CIII über Immunfluoreszenz und native Polyacrylamidgelelektrophorese dargestellt. Bereits in Abschnitt 3.3.1 und 3.3.2 wurde gezeigt, dass die Vertreter der Klassen CI und CII unterschiedliche funktionelle Eigenschaften aufweisen: Während Proteine der Klasse CI über Chaperonaktivität verfügten, traf dies auf Proteine der Klasse CII nicht zu. Bezüglich ihrer Chaperonaktivität zeigten Vertreter dieser beiden Proteinfamilien keine wechselseitige Beeinflussung. Zunächst wurde exemplarisch jeweils ein Vertreter der drei Klassen in Tomatenprotoplasten einzeln und in Kombination exprimiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 16 dargestellt.



**Abb. 16: Expression, intrazelluläre Lokalisation und Oligomerisierung cytoplasmatischer sHsp in Mesophyllprotoplasten.**

(A) Tomatenprotoplasten wurden zur Expression von PsHsp18.1-CI, LpHsp17.4-CII, oder HA-LpHsp16.1-CIII allein oder in Kombinationen wie am rechten Rand angegeben transformiert und nach 18 h Inkubation bei 25°C fixiert und für die Immunfluoreszenzanalyse weiterverarbeitet. Die Bezeichnung des zur Detektion des jeweiligen Proteins verwendeten Antiserums ist über dem entsprechenden Bild zu finden. (B) Native Proteinextrakte wurden aus wie in (A) beschrieben transformierten Protoplasten hergestellt und sHsp-Komplexe mittels nicht-denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Der immunologische Nachweis erfolgte an derselben Membran durch sequentielle Inkubation mit den in der Abbildung angegebenen Antikörpern. Die in (B) dargestellten Ergebnisse entstanden in Zusammenarbeit mit Christian Weber. Mr, relatives Molekulargewicht, angegeben in Kilodalton (kDa).

In der Immunfluoreszenz wurden folgende Grundverhaltensmuster festgestellt:

- Klasse CI-Proteine waren im Allgemeinen löslich in Zellkern und Cytoplasma verteilt (Abb. 16A, Probe 1).
- LpHsp17.4-CII zeigte eine Tendenz, cytoplasmatische Aggregate zu bilden (Probe 3). Klasse CI-Proteine waren in der Lage, diese Aggregate aufzulösen (Proben 2 und 6).
- LpHsp16.1-CIII befand sich allein ausschließlich im Zellkern. (Probe 5). In Gegenwart von Hsp17-CI (Probe 8) oder Hsp17-CII (Probe 4) kolokalisierte ein Teil von LpHsp16.1-CIII mit den genannten Proteinen im Cytoplasma. Wurden LpHsp16.1-CIII und LpHsp17.4-CII coexprimiert, wurde ein Teil von LpHsp16.1-CIII in die von Hsp17.4-CII gebildeten Aggregate inkorporiert (Probe 4).
- Diese Coaggregation von LpHsp17.4-CII und LpHsp16.1-CIII wurde durch PsHsp18.1-CI verhindert (Proben 6 und 7)

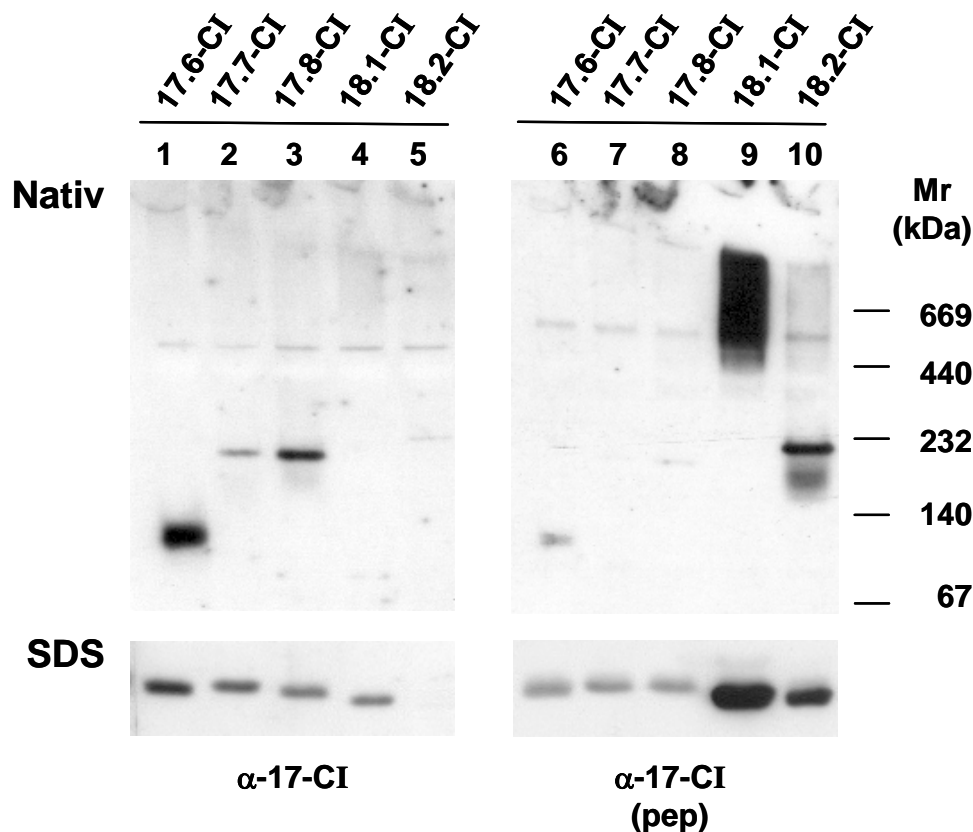
Eine Interaktion von Proteinen der drei Klassen konnte auch auf der Ebene nativer Komplexe gezeigt werden. Dazu wurden PsHsp18.1-CI, LpHsp17.4-CII und LpHsp16.1-CIII in Tabakprotoplasten exprimiert und die Bildung oligomerer Komplexe mittels Polyacrylamidgelelektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen untersucht (Abb. 16B). Die Ergebnisse lassen sich wie folgt kurz zusammenfassen:

- PsHsp18.1-CI bildete ein Oligomer einer Größe von etwa 210 kDa (Spur 2).
- LpHsp17.4-CII konnte in Form von Komplexen nachgewiesen werden, deren Größe etwa 220 kDa bzw. 700 kDa betrug. Ein Teil des Proteins verblieb in der Tasche (Spur 4).
- Hsp16.1-CIII war als nativer Komplex einer Größe von 700 kDa nachweisbar, und auch hier bildete sich ein weiterer, hochmolekularer Komplex, der nicht in das Gel eintrat (Spur 6).
- Sowohl die Coexpression von CI- und CII-Proteinen (Spur 3), als auch von CII- und CIII- (Spur 5), sowie CI- und CIII-Proteinen (Spur 8) führte zu einer Änderung der Größe der nativen Komplexe und somit zu einem veränderten Laufverhalten. Auch bei Coexpression aller drei Proteine änderte sich die Position der Komplexe, und ein Hauptteil der CI, CII und CIII-Proteine war in einem Komplex einer Größe von 220 kDa nachweisbar (Spur 7).

### 3.4.2 Oligomerisierungsverhalten von Klasse CI-sHsp der Tomate und Bildung von Mischkomplexen mit sHsp der Klasse CII

Im vorherigen Abschnitt konnte nachgewiesen werden, dass sHsp der Klassen CI, CII und CIII in der Lage sind, auf der Ebene oligomerer Komplexe zu interagieren, und dass sie ihre intrazelluläre Lokalisation wechselseitig beeinflussen. Dies geschah allerdings nur an einigen ausgewählten Beispielen. Im Vordergrund der in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse steht nun die Charakterisierung der Oligomerformen der fünf Klasse CI-Isoformen aus *Lycopersicon esculentum*, die anhand von EST-Daten identifiziert werden konnten und die mit den in unserer Arbeitsgruppe vorhandenen Antikörpern nachgewiesen werden konnten. Ihre Expression und Chaperonaktivität wurde bereits in den Abschnitten 3.2 und 3.3 beschrieben. Es wurde bereits gezeigt, dass die verschiedenen Isoformen der Klasse CI gleiche Chaperonaktivität aufweisen, die auch durch eine Mischung der Isoformen nicht verstärkt wird (Abb. 15). In den folgenden Versuchen wurde untersucht, ob es nach Coexpression der Isoformen der Klasse CI zur Bildung von Mischkomplexen kommt, und ob diese Bildung von Mischkomplexen speziesspezifisch ist. Weiterhin wurde das Oligomerisierungsverhalten von Klasse CI-sHsp nach Coexpression mit Hsp17-CII analysiert. Dazu wurden die entsprechenden sHsp in CS-Protoplasten exprimiert, native Extrakte hergestellt und die Proteine über nicht-denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt.

Die Charakterisierung der Oligomerformen der sHsp ergab, dass diese Oligomere unterschiedlicher Größe bilden, wenn sie alleine exprimiert werden (Abb. 17). Hsp17.6-CI bildete kleine Oligomere einer Größe von etwa 100 kDa (Spuren 1, 6), Hsp17.7-CI und Hsp17.8-CI dagegen bildeten Dodekamere einer Größe von etwa 220 kDa (Spuren 2 und 3 bzw. 7 und 8). Hsp18.1-CI war in großen Komplexen einer Größe von >700 kDa zu finden (Spuren 4 und 9). Hsp18.2-CI schließlich bildete ebenfalls Komplexe einer Größe von etwa 220 kDa (Spuren 5 und 10). Wie bereits in Abb. 9 gezeigt wurde, weisen die beiden in unserer Arbeitsgruppe vorhandenen Antikörper unterschiedliche Spezifitäten auf: Der polyklonale Antikörper  $\alpha$ -17-CI bindet bevorzugt die Klasse CI-sHsp Hsp17.6-CI, Hsp17.7-CI und Hsp17.8-CI, während der Peptidantikörper  $\alpha$ -17-CI (pep) hauptsächlich Hsp18.1-CI und Hsp18.2-CI erkennt.

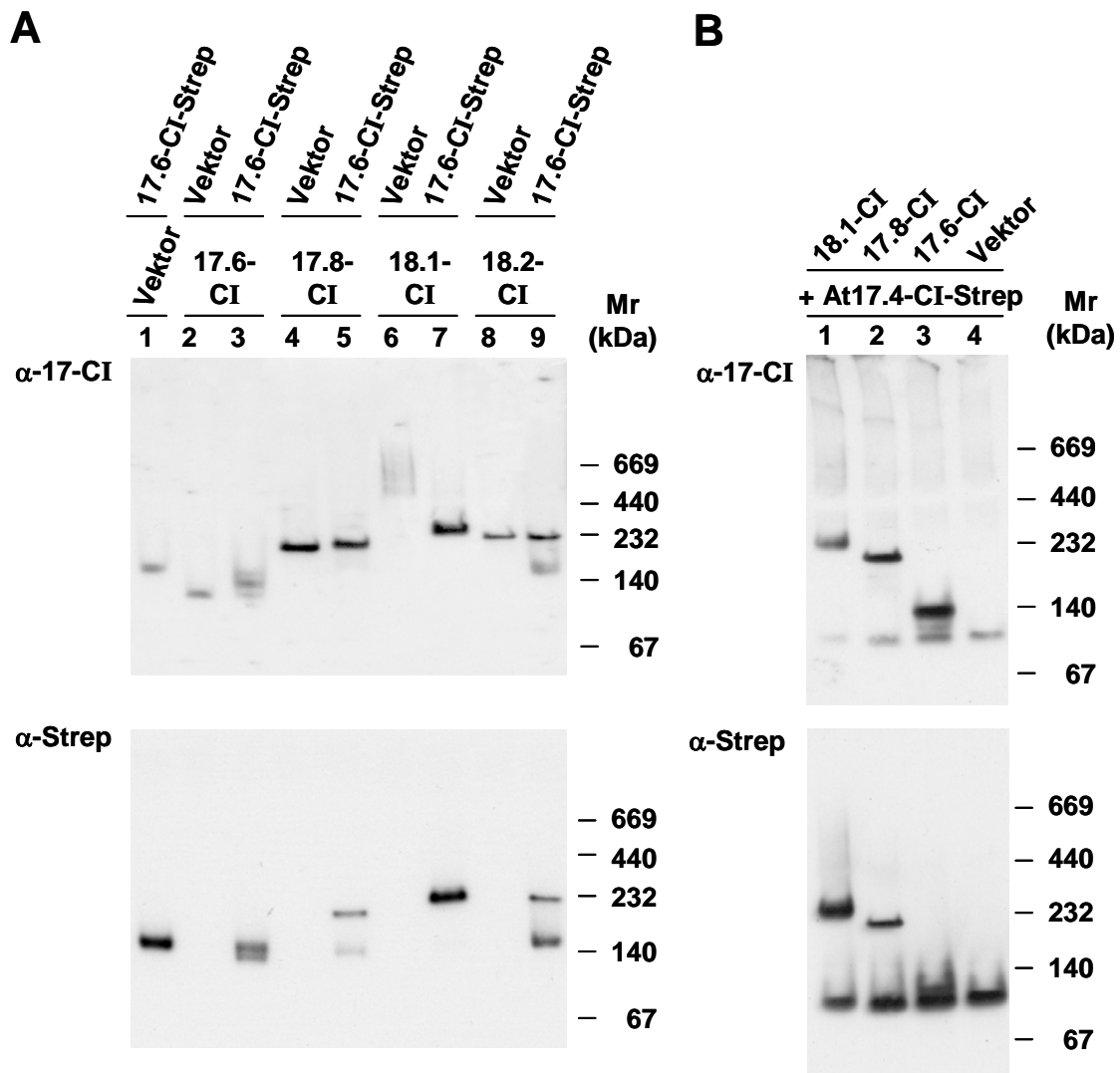


**Abb. 17: Expression und Oligomerisierungsverhalten von Klasse CI-sHsp aus *Lycopersicon esculentum*.**

CS-Protoplasten wurden mit Expressionsvektoren, die für Klasse CI-sHsp kodieren, transformiert (siehe Beschriftung in der Abbildung) und über Nacht bei 25°C kultiviert. Protoplastenextrakte wurden auf einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel (nativ) bzw. auf einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel (SDS) aufgetrennt. Dabei wurden auf die Spuren 1-5 dieselben Extrakte aufgetragen wie auf die Spuren 6-10. Die Gele wurden für die Immunoblot-Analyse weiterverarbeitet. Die Detektion der Klasse CI-sHsp erfolgte mit den Antikörpern  $\alpha$ -17-CI bzw.  $\alpha$ -17-CI (pep). Mr, relatives Molekulargewicht, angegeben in Kilodalton (kDa).

Die fünf Isoformen der Klasse CI aus *Lycopersicon esculentum* bilden also oligomere Komplexe unterschiedlicher Größe. Zur weiteren Charakterisierung des Oligomerisierungsverhaltens der Klasse CI-sHsp wurden Hsp17.6-CI, Hsp17.8-CI, Hsp18.1-CI und Hsp18.2-CI mit Strep-markiertem Hsp17.6-CI coexprimiert, um zu sehen, ob es zur Bildung von Mischoligomeren kommt. Weiterhin wurde am Beispiel von Strep-markierten AtHsp17.4-CI untersucht, ob es zur Bildung von Mischkomplexen aus Klasse CI-sHsp unterschiedlicher Spezies kommt. Da sowohl Hsp17.6-CI als auch AtHsp17.4-CI Oligomere einer geringeren Anzahl von Untereinheiten als die anderen Vertreter der Klasse CI aufweisen, sollte bei einer Bildung von Mischoligomeren eine Veränderung der Oligomergröße deutlich sichtbar werden.





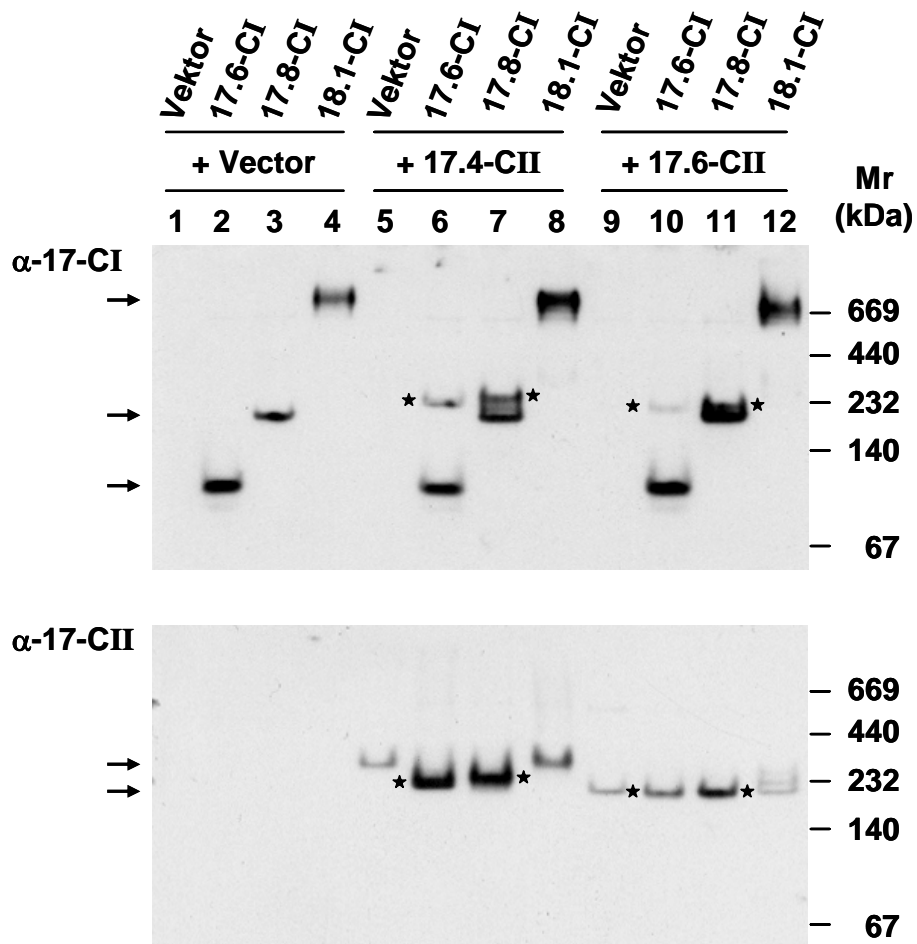
**Abb. 18: Bildung von Mischkomplexen aus sHsp der Klasse CI.**

CS-Protoplasten wurden mit Expressionsvektoren, die für sHsp der Klasse CI kodieren, transformiert und über Nacht bei 25°C inkubiert. Aus den Protoplasten wurden native Extrakte hergestellt und mittels nicht-denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Die Detektion der Klasse CI-sHsp erfolgte mit  $\alpha$ -17-CI, die Detektion Strep-markierter Proteine mit  $\alpha$ -Strep. (A) Expression von Klasse CI-sHsp aus *Lycopersicon esculentum*. Vier Isoformen der Klasse CI (Hsp17.6-CI, Hsp17.8-CI, Hsp18.1-CI und Hsp18.2-CI) wurden allein exprimiert bzw. mit Hsp17.6-CI-Strep coexprimiert. (B) Coexpression von Hsp17.4-CI-Strep aus *Arabidopsis thaliana* mit Hsp17.6-CI, Hsp17.8-CI und Hsp18.1-CI aus *Lycopersicon esculentum*. Mr, relatives Molekulargewicht, angegeben in Kilodalton (kDa).

Es zeigte sich, dass bei Coexpression von Hsp17.6-CI-Strep mit anderen Isoformen der Klasse CI aus *Lycopersicon esculentum* Mischkomplexe gebildet werden (Abb. 18A). Dies wurde besonders deutlich, wenn man die Detektion mit dem Antikörper  $\alpha$ -Strep betrachtet: Bei Coexpression mit Hsp17.6-CI, Hsp17.8-CI, Hsp18.1-CI und Hsp18.2-CI war eine deutliche Größenveränderung der detektierten Komplexe zu beobachten (vergleiche Spur 1 mit Spur 3, 5, 7 und 9). Interessanterweise kam es immer zu einer Bildung eines Cokomplexes, der ungefähr die Größe eines Dodekamers besitzt. Eine Ausnahme bildete die Coexpression von Hsp17.6-CI-Strep mit Hsp17.6-CI. Überraschend war dies insbesondere bei der Coexpression von Hsp17.6-CI-Strep mit Hsp18.1-CI, da beide Proteine alleine exprimiert nicht in der Lage waren, Dodekamere zu bilden (vergleiche Spur 1, 6 und 7). Die in Abb. 18B dargestellten Ergebnisse zur Coexpression von AtHsp17.4-CI mit Hsp17.6-CI, Hsp17.8-CI, Hsp18.1-CI zeigten, dass auch Cokomplexe aus Vertretern unterschiedlicher Spezies entstehen.

Im folgenden Versuch wurde untersucht, ob auch aus Vertretern der Klassen CI und CII aus *Lycopersicon esculentum* Mischoligomere gebildet werden. Dazu wurden Isoformen beider Klassen in CS-Protoplasten coexprimiert (Abb. 19).

Wie bereits in Abb. 17 gezeigt entstanden, wenn Hsp17.6-CI alleine exprimiert wurde, Oligomere einer Größe von etwa 100 kDa (Abb. 19, Spur 2). Hsp17.8-CI bildete Dodekamere einer Größe von etwa 220 kDa (Spur 3), Hsp18.1-CI dagegen Komplexe einer Größe von >700 kDa (Spur 4). Nach Coexpression mit Hsp17.4-CII waren Teile von Hsp17.6-CI und Hsp17.8-CI in neu gebildeten Cokomplexen zu finden, die eine Größe von etwa 240 kDa aufwiesen. In diesen Cokomplexen fand man den gesamten Anteil an Hsp17.4-CII, während nur ein Teil der Hsp17-CI-Isoformen von dem veränderten Laufverhalten betroffen war (Spuren 6 und 7). Die Coexpression von Hsp18.1-CI führte zu keiner vergleichbaren Änderung der Position des Signals von Hsp17.4-CII, und auch die Position des Signals von Hsp18.1-CI selbst änderte sich nicht (Spur 8). Die bei Coexpression von Hsp17.6-CII erhaltenen Ergebnisse waren prinzipiell ähnlich, aber leider weniger eindeutig, da es auch bei einer Bildung von Cokomplexen zu keiner Änderung der Oligomergröße von Hsp17.6-CII kam (Spuren 10, 11 und 12). Bei Detektion von Hsp17-CI ist die Bildung von Cokomplexen von Hsp17.6-CI und Hsp17.8-CI mit Hsp17.6-CII allerdings nachweisbar (Spuren 10, 11).



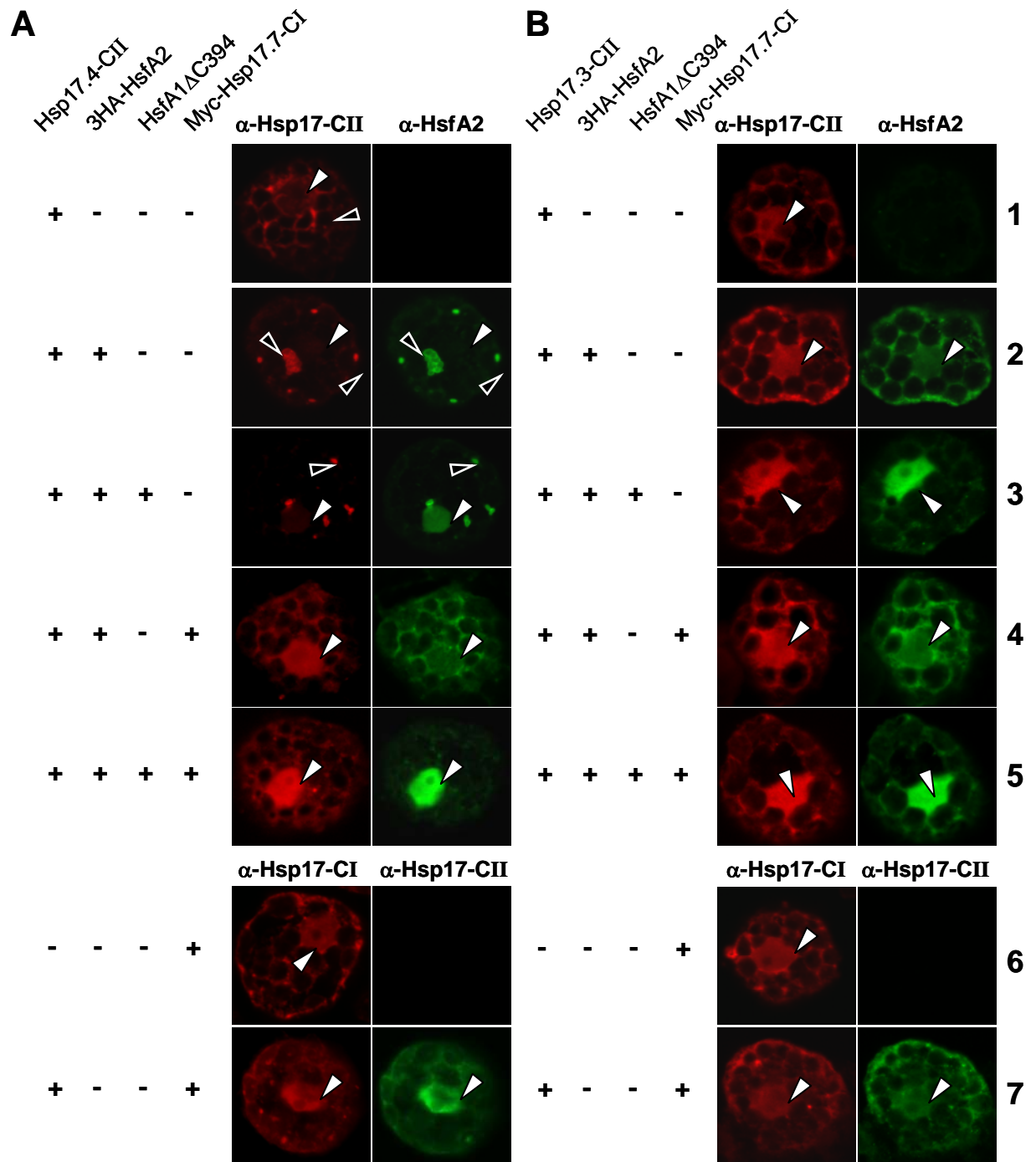
sHsp	Mr (kDa) Homooligomer	Mr (kDa) Mischoligomer
17.6-CI	etwa 100	mit 17.4-CII: etwa 240 mit 17.6-CII: etwa 230
17.8-CI	etwa 220	mit 17.4-CII: etwa 240 mit 17.6-CII: etwa 230
18.1-CI	>700	mit 17.4-CII: keine mit 17.6-CII: keine

**Abb. 19: Bildung von Cokomplexen aus sHsps der Klassen CI und CII aus *Lycopersicon esculentum*.**

(A) Die Bildung von Mischkomplexen der in der Abbildung angegebenen Vertreter der Klassen CI und CII wurde mittels Expression in CS-Protoplasten, nicht-denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließender Immunoblot-Analyse untersucht. Die Positionen homooligomerer Komplexe von Proteinen der Klassen CI und CII sind mit Pfeilen markiert, Sterne markieren die Positionen von Hsp17-CI- und -CII-Mischkomplexen. Am rechten Rand sind die Positionen der Größenmarker angegeben. (B) Zusammenfassende Darstellung der in A gezeigten Ergebnisse. Mr, relatives Molekulargewicht, angegeben in Kilodalton (kDa).

### 3.5 Intrazelluläre Verteilung und Aggregationsverhalten von HsfA2

Bei dem Transkriptionsfaktor HsfA2 aus Tomate handelt es sich um ein hitzestressinduziertes Protein, das über ein hohes Aktivatorpotential verfügt. In Gegenwart von HsfA1 ist HsfA2 trotz seiner starken NES im Zellkern zu finden, möglicherweise in Form eines HsfA2/HsfA1-Heterooligomers (Scharf et al., 1998; Heerklotz et al., 2001). Unter Zuhilfenahme des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems konnte gezeigt werden, dass HsfA2 in der Lage ist, spezifisch mit einem Klasse CII-Protein, LpHsp17.4 zu interagieren, nicht jedoch mit einem weiteren Mitglied der Klasse CII, LpHsp17.3-CII, oder einem anderen Vertreter der Klassen CI oder CII. Coexpression von Hsp17.4-CII, nicht aber Hsp17.3-CII mit HsfA2 in Tabakmesophyllprotoplasten führte zur Bildung unlöslicher Komplexe, wie mittels Ultrazentrifugation nachgewiesen werden konnte. Die spezifische Interaktion zwischen HsfA2 und Hsp17.4-CII beeinflusst auch das Aktivatorpotential von HsfA2: In Reporterassays in Tabakmesophyllprotoplasten zeigte sich, dass die Aktivität von HsfA2 in Gegenwart von Hsp17.4-CII reprimiert ist, während Hsp17.3-CII nur einen schwachen Effekt hat (Port et al., 2004). Wie bereits in Abb. 16 gezeigt wurde, interagiert auch Hsp17-CI mit Hsp17.4-CII und hält das Protein unter Kontrollbedingungen in einem löslichen Zustand. Weiterhin findet eine Interaktion von Proteinen der beiden Klassen auf Ebene der Oligomerisierung statt (Abb. 16 und Abb. 19), wobei verschiedene Vertreter der Klasse CI eine unterschiedliche Affinität zur Bildung solcher Mischkomplexe aufweisen. Um den Einfluss der verschiedenen Arten der Proteininteraktion, wie sie in den vorherigen Abschnitten dargestellt wurden, auf die intrazelluläre Lokalisation von HsfA2 zu untersuchen, wurden LpHsp17.3-CII und LpHsp17.4-CII, sowie LpHsp17.7-CI, HsfA2 und HsfA1 in Tabakprotoplasten unter Kontrollbedingungen coexprimiert. Ihre intrazelluläre Lokalisation wurde mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenz untersucht (Abb. 20). Um die Synthese endogener sHsp zu vermeiden und das Ergebnis nicht zu beeinflussen wurde eine HA-markierte Form von HsfA2 und eine C-terminal verkürzte Form von HsfA1 verwendet. Beide Formen verfügen über ein sehr geringes bzw. kein Aktivatorpotential. Die in Abb. 19 und Abb. 20 gezeigten, im Rahmen meiner experimentellen Arbeiten entstandenen Ergebnisse sind in einer gemeinsamen Arbeit mit Markus Port publiziert (Port et al., 2004).



**Abb. 20: Lokalisierung von HsfA2 und Hsp17-CII in Tabakprotoplasten.**

Die beiden Isoformen von Hsp17-CII, LpHsp17.4-CII (A) und LpHsp17.3-CII (B), wurden alleine (Probe 1) oder in Gegenwart von HA-HsfA2 exprimiert (Proben 2 bis 5). Einige Proben enthielten zusätzlich HsfA1ΔC394 (Proben 3 und 5) oder Myc-Lp17.7-CI (Proben 4, 5, 6 und 7), wie links angegeben. Hsp17-CII wurde im roten oder grünen, HsfA2 im grünen Kanal und Hsp17-CI im roten Kanal nachgewiesen. Geschlossene Pfeile kennzeichnen die Position der Zellkerne, offene Pfeile markieren Aggregate.

Wird Hsp17.4-CII allein exprimiert (Abb. 20A, Probe 1), zeigt sich das Protein teilweise löslich, teilweise aggregiert im Cytoplasma. Nach Coexpression mit HsfA2 (Probe 2) kommt es zur Aggregation und Kolokalisation beider Proteine. In Tripelkombination von Hsp17.4-CII, HsfA2 und HsfA1 (Probe 3) zeigen Hsp17.4-CII und HsfA2 ein ähnliches Verhalten, nur ist nun ein Teil von HsfA2 im Zellkern lokalisiert. Wird Hsp17.7-CI coexprimiert (Proben 4 und 5) verschwinden die cytoplasmatischen Aggregate, die von HsfA2 und Hsp17.4-CII gebildet werden, völlig. Dabei nimmt die Menge an HsfA2, die in Gegenwart von HsfA1 im Kern lokalisiert ist, zu (Vergleiche Proben 3 und 5). Eine ähnliche verstärkte Kernlokalisation ist für Hsp17.4-CII in den entsprechenden Immunfluoreszenzbildern zu beobachten. In Gegenwart von Hsp17.3-CII ist weder eine Aggregation von HsfA2 noch von sHsp zu beobachten (Abb. 20B), und die nukleocytoplasmatische Lokalisation von HsfA2 wird nur durch Coexpression von HsfA1 beeinflusst (Proben 3 und 5).

## **4 Diskussion**

### **4.1 Ausprägung von Thermotoleranz**

Alle Organismen sind in der Lage, einen thermotoleranten Zustand zu erlangen, der ihnen die Fähigkeit verleiht, ansonsten letale Temperaturen zu überleben. Die Ausprägung von Thermotoleranz erfordert eine Vorbehandlung, die in einer kurzen, subletalen, einer moderaten, kontinuierlichen Hitzeeinwirkung, oder einem graduellen Temperaturanstieg, wie sie in natürlicher Umgebung vorkommen könnte, bestehen kann (Übersicht in Nover, 1991). Hitzestress kann sich auf verschiedene Teile oder Funktionen der Zelle sowie der ganzen Pflanze auswirken, und dementsprechend kann eine Vielzahl schützender Effekte beobachtet werden. So kann Thermotoleranz anhand der Wachstumsgeschwindigkeit von Keimlingen oder der Temperatur bestimmt werden, die zu irreversiblen Schädigungen der Pflanze oder von Geweben, bzw. zur Beeinträchtigung von Entwicklungsprozessen führt. Die stark reduzierte Expression von HsfA1 in CS-Pflanzen bewirkte beispielsweise eine erhöhte Temperatursensitivität, die sich zunächst in einer Schädigung des Sprossgewebes äußerte, was vermutlich die Wasser- und Nährstoffversorgung anderer Teile der Pflanze verhinderte. Weiterhin war die Reifung von Früchten von CS-Pflanzen nach einer Hitzestressbehandlung beeinträchtigt. Es fand keine Fruchtreifung mehr statt, das Perikarp war sichtbar geschädigt und wies keine Synthese von Lycopenen auf (Mishra et al., 2002).

Da Thermotoleranz unterschiedliche Teile oder Funktionen der Zelle in unterschiedlichem Maße beeinflusst, empfiehlt es sich zu einem besseren Verständnis der molekularen Grundlagen die Analyse vom Überleben der ganzen Pflanze auf die Analyse von subzellulären Strukturen und Funktionen auszudehnen (Übersicht in Nover, 1991). Beispielsweise verhindert eine Vorbehandlung auf zellulärer Ebene Änderungen in der Fluidität und Intaktheit von Membranen nach Einwirkung hoher Temperaturen, ein Effekt, der über Färbemethoden oder anhand der Durchlässigkeit der Membran für Elektrolyte nachgewiesen werden kann. Weiterhin verhindert sie Störungen des Gleichgewichtes metabolischer Prozesse und der Genexpression (Dewey, 1989). In thermotoleranten Zellen ist nach Hitzestress auch die Struktur des Cytoskelettes weniger stark beeinträchtigt, was anhand der Cytoplasmaströmung als experimentelles Kriterium festgestellt werden kann (Alexandrov, 1994).

Da viele Studien belegen, dass die Synthese von Hsp mit der Ausprägung von Thermotoleranz einhergeht (Übersicht in Vierling, 1991; Parsell und Lindquist, 1993; Waters et al, 1996) und Hsp die Eigenschaft aufweisen, denaturierte Proteine zu binden und ihre Rückfaltung zu ermöglichen, bietet es sich an, Thermotoleranz anhand der Denaturierung und Inaktivierung eines Reporterproteins unter Hitzestress, und seiner Renaturierung in der Erholungsphase nach dem Hitzestress zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Luciferase als Reporterprotein verwendet, ein thermosensitives Protein, das in *in vivo* und *in vitro*-Studien zur Untersuchung der Chaperonfunktion von Proteinen bereits häufig genutzt wurde (Forreiter et al., 1997; Michels et al., 1997; Lee und Vierling, 2000; Löw et al., 2000; Hong et al., 2003).

#### **4.2 *RNA-interference* erlaubt den spezifischen *knock-down* der Expression einzelner Komponenten des Chaperonsystems**

Zur Untersuchung der Funktion einzelner Komponenten des pflanzlichen Chaperonsystems in der Ausprägung von Thermotoleranz verwendeten wir ein transientes Expressionssystem in Mesophyllprotoplasten, wobei grundsätzlich zwei verschiedene Versuchsansätze zur Anwendung kamen: (1) Die betreffenden Proteine wurden transient überexprimiert. (2) Ein weiterer Ansatz war die Verwendung der RNAi (*RNA-interference*)-Technologie. Expressionsplasmide, die *inverted repeats* (IR) von für Hsp kodierender cDNA enthalten, wurden transient in Protoplasten exprimiert. RNAi oder *RNA-silencing*, in Pflanzen auch als Cosuppression und in Pilzen als *quelling* bezeichnet, dient eigentlich der Abwehr fremden genetischen Materials, der Regulation der Genexpression, sowie der Modifizierung zellulärer DNA und assoziierten Chromatins (Übersicht in Mello und Conte, 2004). Doppelsträngige RNA (dsRNA) wirkt als Stimulus und wird von dem Enzym *Dicer* erkannt. Dieses schneidet die dsRNA in kurze Fragmente einer Länge von 21-26 Nucleotiden, die sogenannte *short interfering RNA* (siRNA). Die siRNA wird von dem sogenannten RISC (*RNA-induced silencing complex*) aufgewunden, und der Komplex wird aktiviert. Der aktivierte Komplex bindet nun spezifisch an die zur siRNA komplementäre RNA, was zu deren Spaltung oder zu einem Stopp ihrer Translation führt. Das Signal kann durch die Synthese neuer dsRNA durch die *RNA directed RNA polymerase* (RdRP) verstärkt werden, wobei die siRNA als Primer dient.



In Pflanzen sind drei Mechanismen des *RNA-silencing* bekannt (Übersicht in Baulcombe, 2004). Alle diese Mechanismen beinhalten die Spaltung doppelsträngiger RNA (dsRNA) in kurze Fragmente durch das Enzym *Dicer*. Da zum Teil die gleichen Proteine an allen drei Mechanismen beteiligt sind, können diese nicht klar voneinander abgegrenzt werden. (1) Das cytoplasmatische *RNA-silencing* ist vor allem in Virus-infizierten Pflanzenzellen von Bedeutung, in denen dsRNA als Zwischenstufe viraler Replikation oder infolge der Bildung von Sekundärstrukturen in einzelsträngiger RNA vorkommt. (2) micro-RNA (miRNA) wird wie siRNA durch das Enzym *Dicer* gebildet, bewirkt das *silencing* endogener mRNA und ermöglicht so eine Regulation der Genexpression. Dabei bindet die miRNA, assoziiert mit RISC, an die komplementäre Ziel-mRNA und bewirkt deren Abbau oder eine Blockade der Translation. (3) *RNA-silencing* steuert in Pflanzen weiterhin die Methylierung der DNA und kann zu einer Unterdrückung der Transkription führen. Es gibt Hinweise, dass die Methylierung der DNA mit einer Modifizierung von Histonen in Zusammenhang steht.

RNAi ist mittlerweile als Technik zur Untersuchung der Funktion spezifischer Gene in einer Vielzahl von Organismen etabliert. RNAi kann durch Transformation mit *inverted repeat*-Konstrukten ausgelöst werden, weiterhin kann chemisch synthetisierte siRNA eingesetzt werden, um *RNA-silencing* zu induzieren (Elbashir et al., 2001). Auch die Wirkung der *antisense*-Technik beruht wohl nicht auf einer passiven Blockade der Translation durch Basenpaarung zwischen der *sense*-mRNA und der komplementären *antisense*-RNA, sondern vielmehr auf der Auslösung von RNAi (Fire et al., 1998). Auch im Fall der für unsere Experimente verwendeten CS-Pflanzen konnte die Bildung von RNAi eindeutig nachgewiesen werden. Die Integration zweier Transgenkassetten in Form eines *inverted repeat* führte zur Bildung von doppelsträngiger mRNA und zum *RNA-silencing*. Die infolge dieses Prozesses auftretenden doppelsträngigen RNA-Fragmente einer Größe von etwa 21 Nukleotiden konnten in CS-Pflanzen, nicht aber in WT-Pflanzen nachgewiesen werden (Mishra et al., 2002). Mit Hilfe von genspezifischen IR-Konstrukten konnten wir den Mechanismus des *RNA-silencing* auch in unserem transienten Reporterassay erfolgreich nutzen, um die Bildung einzelner Komponenten des Chaperonsystems zu verhindern und damit ihre Rolle in der pflanzlichen Thermotoleranz zu untersuchen.

#### 4.3 Vertreter der Hsp70-Familie schützen Proteine vor der Denaturierung und spielen eine Rolle bei ihrer Rückfaltung

Viele Studien haben gezeigt, dass Hsp70 und Hsc70 am Schutz und an der Rückfaltung denaturierter Proteine beteiligt sind (Nimmesgern und Hartl, 1993; Schumacher et al., 1994; Schumacher et al., 1996; Freeman et al., 1995; Minami et al., 1996). Auch auf Ebene des Überlebens der ganzen Pflanze konnte die Bedeutung von Vertretern der Hsp70-Familie in der pflanzlichen Thermotoleranz nachgewiesen werden. In *Arabidopsis thaliana* führte eine durch Transformation mit *antisense*-Kassetten hervorgerufene Reduktion der Hsp70-Expression zu einer verminderten Thermotoleranz (Lee und Schöffl, 1996). Der *knock-down* eines konstitutiv exprimierten Vertreters der Hsp70-Familie aus *Arabidopsis thaliana*, Hsc70-1, erwies sich als letal, wie neuere Ergebnisse von Sung und Guy (2003) zeigten. Bisher wurde jedoch keine vergleichende Analyse der Chaperonfunktion einzelner Vertreter der Hsp70-Familie eines Organismus vorgenommen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte solch eine Analyse unter Einsatz der RNAi-Technologie durchgeführt werden. Dies wurde durch die Verwendung der nicht-konservierten 3'-UTR zur Herstellung der *inverted repeat*-Konstrukte ermöglicht (siehe auch Abb. 24 im Anhang).

Interessanterweise zeigte sich eine Korrelation zwischen dem Expressionsverhalten der einzelnen Isoformen und ihrer Chaperonfunktion. Den stärksten Effekt auf Protektion und Renaturierung der Luciferase übten die HsfA1-abhängigen, hitzestressinduzierbaren Isoformen der Hsp70-Familie, Hsp70-5 und Hsp70-6 aus (vergleiche Abb. 8 und Abb. 14; Tab. 4). Die geringere Auswirkung des *knock-down* konstitutiv exprimierter Isoformen von Hsp/Hsc70 kann auf funktionelle Unterschiede zurückgeführt werden, ist aber möglicherweise die Folge einer hohen Proteinstabilität, die dazu führt, dass trotz der Abwesenheit von mRNA noch Protein in ausreichend hoher Menge vorhanden ist. Nur mittels zwei-dimensionaler Gelelektrophorese könnte die Effektivität der *inverted repeats* gegen die konstitutiven Isoformen letztlich nachgewiesen werden.

Interessant ist vor allen Dingen der Effekt des *knock-down* von Hsp70-1, der zu einer verbesserten Thermotoleranz führt. Möglicherweise handelt es sich bei diesem Protein um einen Coregulator der Hsf-Aktivität. Für eine solche Funktion pflanzlicher Vertreter der Hsp70-Familie gibt es bereits einige Hinweise. Ein Vertreter der Hsp70-Familie

wurde in einem Hefe-Zwei-Hybrid-Screening als Interaktionspartner von Tomaten-HsfA1 (HsfA1a) identifiziert (Lyck, 1998). Und in *antisense*-Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*) mit reduzierter Expression von hitzestressinduzierbarem Hsp70 konnte eine Funktion dieses Hsp in der Regulation der Hsf-Aktivität nachgewiesen werden. Hsf1 (HsfA1a) war in diesen Pflanzen in der Erholungsphase nach dem Hitzestress länger aktiv (Lee und Schöffl, 1996). Hsp70 interagiert weiterhin mit Hsf1 (HsfA1a) im Hefe-Zwei-Hybrid-System und bindet an Hsf1 in seiner HSE-gebundenen Form (Kim und Schöffl, 2002). Hsp70 ist also in Pflanzen neben seiner Funktion in der Thermotoleranz möglicherweise noch in andere Prozesse involviert.

**Tab. 4: Zusammenfassung der Daten zur Chaperonaktivität von Hsp.**

	Transiente Expression in CS-Protoplasten		Knock-down in WT-Protoplasten	
	Protektion	Renaturierung	Protektion	Renaturierung
<b>Hsp17-CI</b>	++	-	+++	+
<b>Hsp17.6-CI</b>	++	-	n.a.	n.a.
<b>Hsp17.7-CI</b>	++	-	n.a.	n.a.
<b>Hsp 17.8-CI</b>	++	-	n.a.	n.a.
<b>Hsp18.1-CI</b>	++	-	n.a.	n.a.
<b>Hsp18.2-CI</b>	++	-	n.a.	n.a.
<b>Hsp17-CII</b>	-	-	+	-
<b>Hsp17.4-CII</b>	-	-	n.a.	n.a.
<b>Hsp17.6-CII</b>	-	-	n.a.	n.a.
<b>Hsp70</b>	- (n.d.)	- (n.d.)	+++	++
<b>Hsp70-1</b>	n.a.	n.a.	-*	-*
<b>Hsp70-3</b>	- (n.d.)	- (n.d.)	-	-
<b>Hsp70-4</b>	n.a.	n.a.	(+)	(+)
<b>Hsp70-5</b>	- (n.d.)	- (n.d.)	+	+
<b>Hsp70-6</b>	n.a.	n.a.	+	+
<b>Hsp101</b>	-	++	+	+++

Die Daten zum Einfluss der transienten Expression der in der Tabelle angegebenen Hsp bzw. des *knock-down* ihrer Expression auf Protektion und Renaturierung von Luciferase wurden verglichen. Durch die Anzahl der „+“ wird im Fall der Überexpression die Verbesserung der Protektion oder Renaturierung angezeigt, im Fall des „knock-downs“ das Ausmaß der Beeinträchtigung. - = kein Effekt; (+) = geringer Effekt; +++ = sehr starker Effekt; n.a. = nicht analysiert; n.d. = im Ergebnisteil dieser Arbeit nicht dargestellt. \*Der *knock-down* der Expression von Hsp70-1 führte sowohl zu einer verbesserten Protektion als auch zu einer verbesserten Renaturierung.

Eine Überexpression sowohl eines konstitutiven als auch eines hitzestressinduzierten Vertreters der Hsp70-Familie beeinflusste in unseren Versuchen weder die Protektion noch die Renaturierung der Luciferase (nicht gezeigt). Hier liegt also eine scheinbare Diskrepanz zwischen den mit den beiden Systemen erhaltenen Ergebnissen vor. Dieses Ergebnis kann damit erklärt werden, dass die Aktivität von Hsp70 von einer Reihe von Cochaperonen abhängig ist. Die Rückfaltung von Substraten durch Hsp70 erfolgt in einem ATP-abhängigen Zyklus. Hsp70 weist in seiner ATP-gebundenen Form nur eine geringe Substrataffinität auf. Das Cochaperon Hsp40 stimuliert die ATP-Hydrolyse durch Hsp70 und ist weiterhin für die Beladung von Hsp70 mit dem Polypeptidsubstrat verantwortlich. Hsp70 in seiner ADP-gebundenen Form verfügt über eine hohe Substrataffinität. Nach ADP/ATP-Austausch kann das Substrat wieder freigesetzt werden. Ein Faktor, der für den Nucleotidaustausch benötigt wird, ist das Protein BAG-1 (Höhfeld und Jentsch, 1997). BAG-1 interagiert mit der ATP-Bindungsstelle von Hsp70 (Demand et al., 1998). Weitere Proteine, die für die Funktion von Hsp70 eine Rolle spielen, sind HIP (*Hsp70 interacting protein*) und HOP (*Hsp70 organizing protein*): HIP bindet Hsp70 nur, wenn dessen ATPase-Aktivität zuvor durch Hsp40 stimuliert wurde. Es stabilisiert die ADP-gebundene Form von Hsp70 (Höhfeld et al., 1995). HOP interagiert sowohl mit Hsp70 als auch mit Hsp90. Man spekuliert, dass HOP als Bindeglied zwischen dem Hsp 70- und dem Hsp90-Chaperonsystem fungiert (Johnson et al., 1998). Die Gegenwart von Hsp40 ist für die durch Hsp70 vermittelte Renaturierung hitzedenaturierter Luciferase essentiell (Schumacher et al., 1996, Johnson et al., 1998, Lee und Vierling, 2000). Auch HIP (Nollen et al., 2001) bzw. HOP und Hsp90 (Johnson et al., 1998) tragen zur Funktion des Hsp70/Hsp40-Systems in der Rückfaltung denaturierter Luciferase bei. Um einen Effekt durch die Überexpression von Hsp70 auf Protektion und Renaturierung von Luciferase zu erzielen, müssten also vermutlich dessen Cochaperone, insbesondere Hsp40, coexprimiert werden.

#### **4.4 Hsp101 ist für die Rückfaltung denaturierter Proteine von Bedeutung**

Bereits in Bakterien und Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) konnte gezeigt werden, dass Vertreter der Hsp100-Familie für die Ausprägung von Thermotoleranz essentiell sind (Schirmer et al., 1996). Dass dies auch in Pflanzen der Fall ist, konnte in *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen werden. In *antisense*-Pflanzen mit verringerter Expression von Hsp101 zeigte sich eine verminderte Thermotoleranz nach einer moderaten konditionierenden Vorbehandlung (Queitsch et al., 2000). Die Mutation des für Hsp101

kodierenden Gens (*hot1*) führte zu einer Beeinträchtigung der Thermotoleranz dieser Mutanten, wie anhand der Untersuchung des Hypokotylwachstums von Keimlingen und der Akkumulation von Chlorophyll nachgewiesen werden konnte (Hong und Vierling, 2001; Hong et al., 2003). Nach Kreuzung der Mutanten mit transgenen Pflanzen, die Luciferase unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors exprimieren, und darauf folgender Untersuchung der Thermostabilität der Luciferase zeigte sich, dass in den Mutanten im Vergleich zum WT eine stark verringerte Reaktivierung von Luciferase stattfindet. Die Protektion von Membranen ist dagegen nicht beeinträchtigt, sie weisen im Vergleich zum WT nach Hitzestress keine erhöhte Durchlässigkeit für Elektrolyte auf (Hong et al., 2003).

Auch die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse belegen die Beteiligung von Hsp101 an der Reaktivierung denaturierter Proteine (Abb. 12 und Abb. 15; Tab. 4). Hsp101 beeinflusst im Unterschied zu Hsp70 nur die Reaktivierung stark, und hat auf die Protektion der Luciferase nur einen moderaten Effekt. Hsp101 ist also in Pflanzen analog zu seiner Funktion in Hefe und Bakterien an der Renaturierung denaturierter Proteine beteiligt und trägt vermutlich auf diese Weise zur Ausprägung von Thermotoleranz bei (Glover and Lindquist, 1998; Mogk et al., 1999; Zolkiewski, 1999).

#### **4.5 sHsp der Klasse CI, nicht aber der Klasse CII sind an der Protektion der Luciferase beteiligt**

Die Bedeutung von sHsp für die Thermotoleranz konnte bereits am Beispiel von Hsp17.7-CI aus der Karotte gezeigt werden. Transformation mit einer *antisense*-Kassette führte zu einer Beeinträchtigung der Thermotoleranz, während transgene Pflanzen mit konstitutiver Expression von Hsp17.7-CI eine gegenüber dem WT verbesserte Thermotoleranz aufwiesen (Malik et al., 1999). Ein Nachweis der Chaperonaktivität von sHsp der Klasse CI erfolgte an vielen Beispielen unter Verwendung unterschiedlicher Substrate *in vivo* (Forreiter et al., 1997; Löw et al., 2000) und *in vitro* (Lee et al., 1997; Lee und Vierling, 2000; Basha et al., 2004). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente belegen ebenfalls, dass CI-sHsp über Chaperonaktivität verfügen. Die Überexpression von Klasse CI-sHsp bewirkte eine Protektion von Luciferase während eines Hitzestresses. Der *knock-down* der Expression von Proteinen der Klasse CI bestätigte diese Beobachtung (Abb. 12, Abb. 15; Tab. 4). Zudem war hier auch eine Beeinträchtigung der Renaturierung zu sehen,

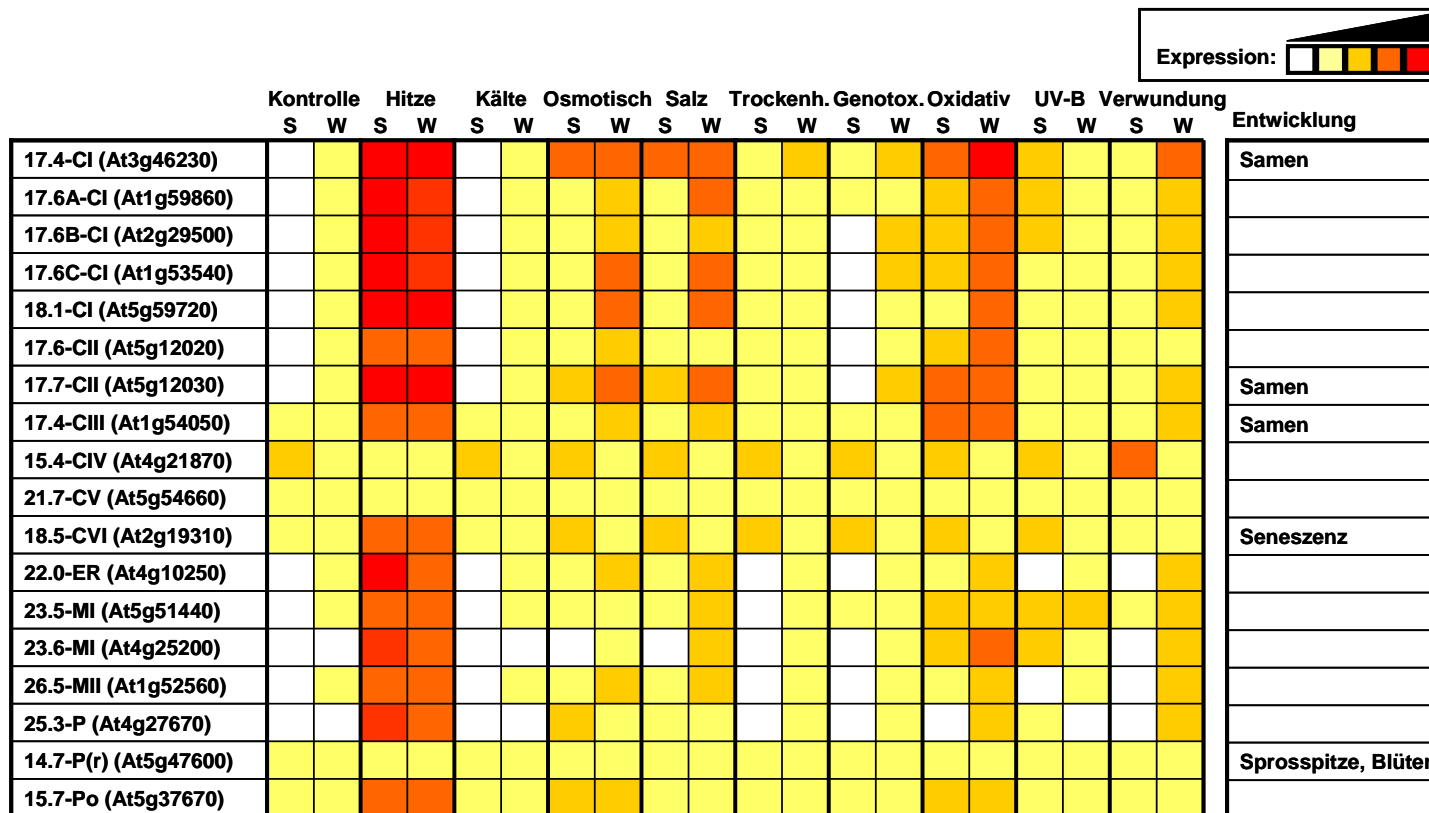
möglicherweise weil die Bindung an Klasse CI-sHsp erst eine Renaturierung durch das Hsp70/Hsp40-System erlaubt (Lee und Vierling, 2000). Innerhalb der Klasse CI unterscheiden sich die untersuchten Vertreter bezüglich ihrer Chaperonaktivität kaum. Es finden sich also keine Hinweise auf mögliche funktionelle Unterschiede (Abb. 15). Solche Unterschiede deuten sich nur bei Analyse der Fähigkeit der verschiedenen Isoformen der Klasse CI an, Heterooligomere mit Klasse CII-Proteinen zu bilden (Abb. 19). Hsp18.1-CI weist hier eine weniger ausgeprägte Tendenz zur Interaktion auf als die anderen untersuchten Isoformen der Klasse CI. Eine mögliche funktionelle Konsequenz zeigt sich, wenn man den Einfluss der Isoformen auf die Interaktion zwischen HsfA2 und Hsp17.4-CII betrachtet (Port et al., 2004). Hsp18.1-CI hat einen geringeren Effekt auf die Löslichkeit des HsfA2/Hsp17.4-CII-Komplexes im Vergleich zu anderen Vertretern der Klasse CI.

Die Ergebnisse bezüglich der Chaperonaktivität von sHsp der Klasse CII sind widersprüchlicher. Der *knock-down* der Expression von Proteinen der Klasse CII zeigte nur einen geringen Effekt auf Protektion und Renaturierung der Luciferase, ebenso gering war der Einfluss ihrer Überexpression (Abb. 12 und Abb. 15; Tab. 4). Eine transiente Expression von LpHsp17.3-CII in *Arabidopsis thaliana*-Zellkultur bewirkte eine Stabilisierung der Luciferaseaktivität unter Hitzestress, auch wenn diese geringer als die Stabilisierung war, die durch die Überexpression von LpHsp17.7-CI oder durch das endogene Chaperonsystem erreicht wurde (Löw et al., 2000). PsHsp17.7-CII und PsHsp18.1-CI sind beide in der Lage, Citratsynthase *in vitro* vor der thermischen Aggregation zu schützen. Aber auch hier erwies sich das CI-Protein als effektiveres Chaperon (Lee et al., 1995). Es kann allerdings nicht von der Hand gewiesen werden, dass bei den im Rahmen meiner Arbeit vorgestellten Versuchen auch eine Substratspezifität der sHsp eine Rolle spielen könnte. Eine solche Substratspezifität konnte *in vitro* am Beispiel von Hsp16.9C-CI und Hsp17.8C-CII aus Weizen gezeigt werden: Hsp16.9C-CI verhinderte effektiver die hitzeinduzierte Aggregation von Malat-Dehydrogenase, während Luciferase stärker von TaHsp17.8C-CII vor Aggregation geschützt wurde (Basha et al., 2004).

Proteine der Klasse CII sind möglicherweise unter Einwirkung anderer Stressoren von Bedeutung. Eine erhöhte Expression von Hsp17-CII in *Arabidopsis thaliana* beispielsweise bewirkte keine erhöhte Resistenz gegen Hitzeeinwirkung, führte aber zu einer erhöhten Austrocknungs- und Salztoleranz (Sun et al., 2001). Weitere Hinweise

auf hitzestressunabhängige Funktionen von sHsp ergaben sich aus der Analyse des Transkriptoms von *Arabidopsis thaliana* unter Verwendung von Microarrays im Rahmen des Projektes AtGenExpress. Eine kurze Übersicht über die bezüglich der Expression von sHsp gewonnenen Daten findet sich in Abb. 21, nähere Informationen finden sich unter <http://arabidopsis.org/info/expression/ATGenExpress.jsp>.

Am Beispiel von LpHsp17.4-CII konnten wir eine neue Funktion einer Klasse CII-sHsp zeigen. LpHsp17.4 ist an der Regulation der Aktivität und intrazellulären Verteilung eines Hitzestresstranskriptionsfaktors, HsfA2, beteiligt (Port et al., 2004, Abb. 20).



**Abb. 21: Zusammenfassende Darstellung der Microarray-Daten zur Expression von sHsp in *Arabidopsis thaliana*.**

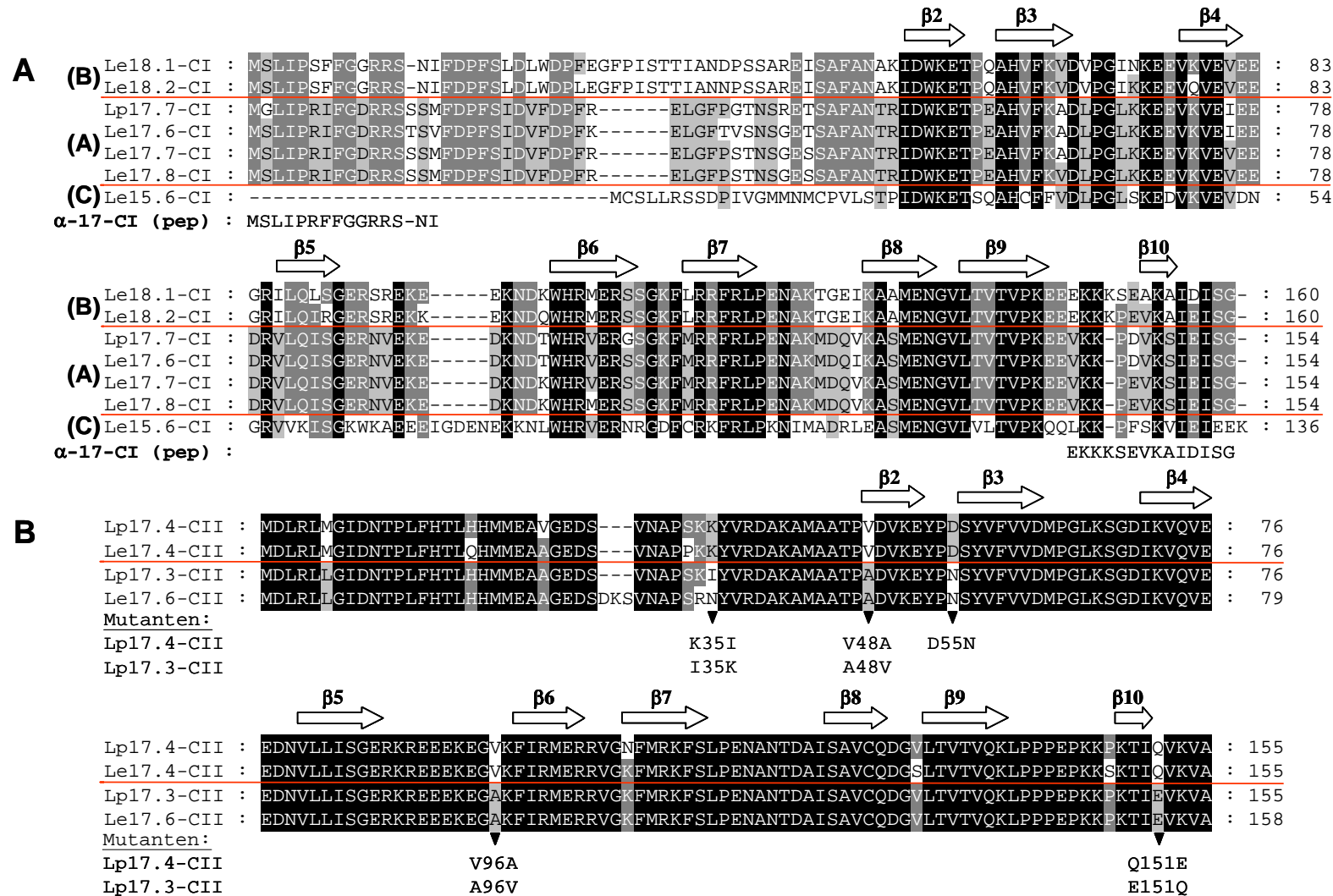
Weitere Informationen zum Projekt AtGenExpress und zu den Stressbehandlungen finden sich im Internet unter <http://arabidopsis.org/info/expression/ATGenExpress.jsp>. C, Cytoplasma; ER, Endoplasmatisches Reticulum; Genotox., Genotoxischer Stress; M, Mitochondrien; P, Plastiden; Po, Peroxisomen; S, Spross; Trockenh., Trockenheit; W, Wurzel. Um die Identifizierung zu erleichtern, sind die Datenbank-Nummern der entsprechenden Gene angegeben. Details sind unter <http://mips.gsf.de/proj/thal/db/search/> erhältlich.



#### 4.6 Oligomerisierung und Chaperonfunktion von sHsp

Es ist unklar, welche strukturellen Voraussetzungen und welcher oligomere Zustand für die Chaperonaktivität eines Proteins nötig sind. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten CI-sHsp wiesen trotz zum Teil großer Sequenzhomologie (Abb. 22) verschiedene Oligomergrößen auf (Abb. 17). Dies scheint jedoch für ihre Chaperonaktivität keine Rolle zu spielen (Abb. 15). sHsp aus unterschiedlichen Organismen weisen eine große Vielfalt oligomerer Strukturen auf. Die minimale Anzahl an Untereinheiten, die eine Protektion von Proteinen erlaubt, ist nicht bekannt. Eine Verkürzung des C-Terminus von *Methanococcus jannaschii* Hsp16.5 beispielsweise führte zur Bildung eines Tetramers, das dennoch in der Lage war, die Löslichkeit seines Substrates aufrechtzuerhalten (Kim et al., 2003). Eine verkürzte Variante von  $\alpha$ -Crystallin, welche nur noch die  $\alpha$ -Crystallin-Domäne beinhaltete, bildete Dimere, die über eine signifikante Chaperonaktivität verfügten (Feil et al., 2001). Die Untersuchung zweier Mutanten von Hsp16.6 aus *Synechocystis* zeigte, dass die Oligomerisierung von sHsp nicht direkt mit ihrer Chaperonaktivität korreliert. Beide Mutanten wiesen einen Defekt in der Oligomerisierung auf, der in der Bildung von Dimeren resultierte. Die Mutationen befanden sich in hydrophoben Regionen der  $\alpha$ -Crystallin-Domäne bzw. der C-terminalen Verlängerung ( $\beta$ 10), die an der Grenzfläche zweier Dimere lokalisiert und an der Stabilisierung der oligomeren Struktur beteiligt sind. Die Mutation in der  $\alpha$ -Crystallin-Domäne beeinträchtigte die Chaperonaktivität des Proteins weitaus stärker (Giese und Vierling, 2004).

Die Disassemblierung der sHsp-Oligomere zu Dimeren, die Exposition zuvor in der oligomeren Struktur gebundener hydrophober Aminosäurereste, und die Reassemblierung der Dimere mit dem Substrat zu einem Komplex stellen entscheidende Schritte bei der Protektion denaturierender Proteine dar. Daher ist die Identifikation von Kontakten, die an der Oligomerisierung von sHsp beteiligt sind, eine wichtige Voraussetzung zum Verständnis der Chaperonaktivität von sHsp, auch wenn die oligomeren Interaktionsflächen nicht immer mit den Substratbindestellen identisch sind, und das Dimer in einigen Fällen die für die Protektion denaturierender Proteine ausreichende Grundeinheit darstellt.



**Abb. 22: Sequenzvergleich der Isoformen von sHsp der Klassen CI und CII in Tomate (Lp, *Lycopersicon peruvianum*; Le, *Lycopersicon esculentum*).**

In (A) sind die Aminosäuresequenzen von Klasse CI-, und in (B) von Klasse CII-sHsp dargestellt. Die β-Stränge β2-β9 sind über der Aminosäuresequenz dargestellt. Die Vorhersage der Sekundärstruktur erfolgte unter Berücksichtigung der Daten von van Montfort et al. (2001) Unter der Sequenz der Klasse CI-sHsp findet sich die Sequenz der Peptide, die bei der Herstellung des Antikörpers α-17-CI (pep) zur Immunisierung verwendet wurden. Die Positionen der in den Mutanten von LpHsp17.4-CII and LpHsp17.3-CII ausgetauschten Aminosäurereste (Port et al., 2004) sind mit Pfeilen markiert. Erläuterungen siehe Text.

Ob die Bildung von Heterooligomeren aus den verschiedenen Vertretern der Klasse CI von Bedeutung für deren Chaperonfunktion ist, konnte mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten nicht abschließend geklärt werden. Eine Mischung der Isoformen führte im Vergleich zu den Isoformen allein zu keiner verbesserten Chaperonaktivität. Allerdings könnte ein Einfluss der Bildung von Heterooligomeren auf die Chaperonfunktion von CI-sHsp von einer genau definierten Zusammensetzung und Stöchiometrie solcher heterooligomerer Komplexe abhängen, die nur unter genau definierten Versuchsbedingungen *in vitro* nachgestellt werden könnten. Am Beispiel von  $\alpha$ A- und  $\alpha$ B-Crystallin konnte gezeigt werden, dass diese optimale Chaperonaktivität in einer 3:1-Stöchiometrie entfalten. Der Mischkomplex verfügte weiterhin über eine größere thermische Stabilität und war kompakter als jedes der Homooligomere allein (Sun et al., 1998). Man könnte sich vorstellen, dass Veränderungen in der Zusammensetzung eines solchen Heterooligomers möglicherweise die Bindungseigenschaften und Substratspezifität beeinflussen.

#### **4.7 Bildung von HSG-Komplexen und Interaktion cytoplasmatischer sHsp**

Die Bildung von HSG-Komplexen ist ein Charakteristikum der pflanzlichen Hitzstressantwort. Diese cytoplasmatischen Komplexe sind aus 40 nm-Partikeln zusammengesetzt. Ihre Bildung ist in Zellen besonders ausgeprägt, die eine hohe Kapazität für die Synthese von Hsp aufweisen, wie z.B. meristematische Zellen, besonders schnell wachsende Zellen, oder Mesophyllprotoplasten (Nover et al., 1983, 1989). Obwohl cytoplasmatische sHsp die Hauptkomponenten darstellen, sind auch andere hitzstressinduzierbare Proteine, wie Hsp70 oder HsfA2 an der Assemblierung dieser charakteristischen Strukturen beteiligt (Neumann et al., 1987; Scharf et al., 1998; Kirschner et al., 2000). Da all diese essentiellen Komponenten in CS-Protoplasten fehlten, konnte nach Einwirkung eines Hitzestresses keine Bildung von HSG-Komplexen beobachtet werden (Abb. 5, Abb. 6). HSG-Komplexe waren in der Lage, denaturierte Proteine, wie hier am Beispiel von Luciferase gezeigt werden konnte, zu binden. Die Bindung der Luciferase an die HSG-Komplexe ging mit dem Schutz der Luciferase vor einer irreversiblen Schädigung nach Hitzestress einher (Abb. 4-Abb. 6). Es scheint also, als bildeten die cytoplasmatischen Multichaperonkomplexe eine Matrix zur Stabilisierung denaturierter Proteine, wie dies bereits für sHsp vorhergesagt wurde (Kimpel und Key, 1985). Die Untersuchung der Interaktionen von drei Klassen

cytoplasmatischer sHsp und ihrer intrazellulären Verteilung zeigte, dass jeder dieser Klassen eine unterschiedliche Funktion im Netzwerk cytoplasmatischer sHsp zukommt. Wie bereits von Kirschner et al. (2000) gezeigt werden konnte, spielen Klasse CII-sHsp bei Coexpression mit Klasse CI-sHsp möglicherweise eine Rolle in der Rekrutierung von Klasse CI-sHsp in HSG-Komplexen ähnliche Strukturen. Die starke Tendenz der Klasse CII-Proteine zu autoaggregieren könnte eine Voraussetzung für diese spezifische Eigenschaft sein. Im Fall von Hsp17.4-CII aus Tomate konnte eine Bildung cytoplasmatischer Aggregate und eine Rekrutierung von Hsp16.1-CIII beobachtet werden (Abb. 16). Im Unterschied dazu verfügten Klasse CI-Proteine über die Fähigkeit, die Aggregate, die von Klasse CII-Proteinen gebildet werden, aufzulösen. Wenn endogene sHsp in Zellkultur oder Blättern nach einem Hitzestress in ihrer natürlichen Zusammensetzung exprimiert werden, könnten die Vertreter der Klasse CI Vertreter anderer Klassen z.B. in der Erholungsphase nach dem Hitzestress in einem löslichen Zustand halten. Eine Aggregation kleiner Hsp und die Bildung von HSG-Komplexen kann nur nach länger andauerndem Hitzestress beobachtet werden. Eine Auflösung dieser Aggregate könnte von dem Verhältnis von Hsp17-CI zu Hsp17-CII abhängen.

Vertreter der cytoplasmatischen Klasse CIII zeichnen sich gegenüber Vertretern der beiden anderen cytoplasmatischen Klassen CI und CII durch einige besondere Eigenschaften aus: (1) das Protein zeigt im Gegensatz zu CI- und CII-sHsp klassenübergreifende Interaktionen im Hefe-Zwei-Hybrid-System, (2) eine Anhäufung basischer Aminosäurereste zwischen den  $\beta$ 5- und  $\beta$ 6-Strängen der ACD mit der Konsensus-Sequenz NGKRKR bewirkt eine Kernlokalisation der CIII-Proteine (Siddique et al., 2003). Hsp17-CIII könnte als eine Art Vermittler zwischen den Vertretern der beiden anderen cytoplasmatischen Klassen fungieren.

#### **4.8 Die Aktivität von HsfA2 wird von einem sHsp der Klasse CII reguliert**

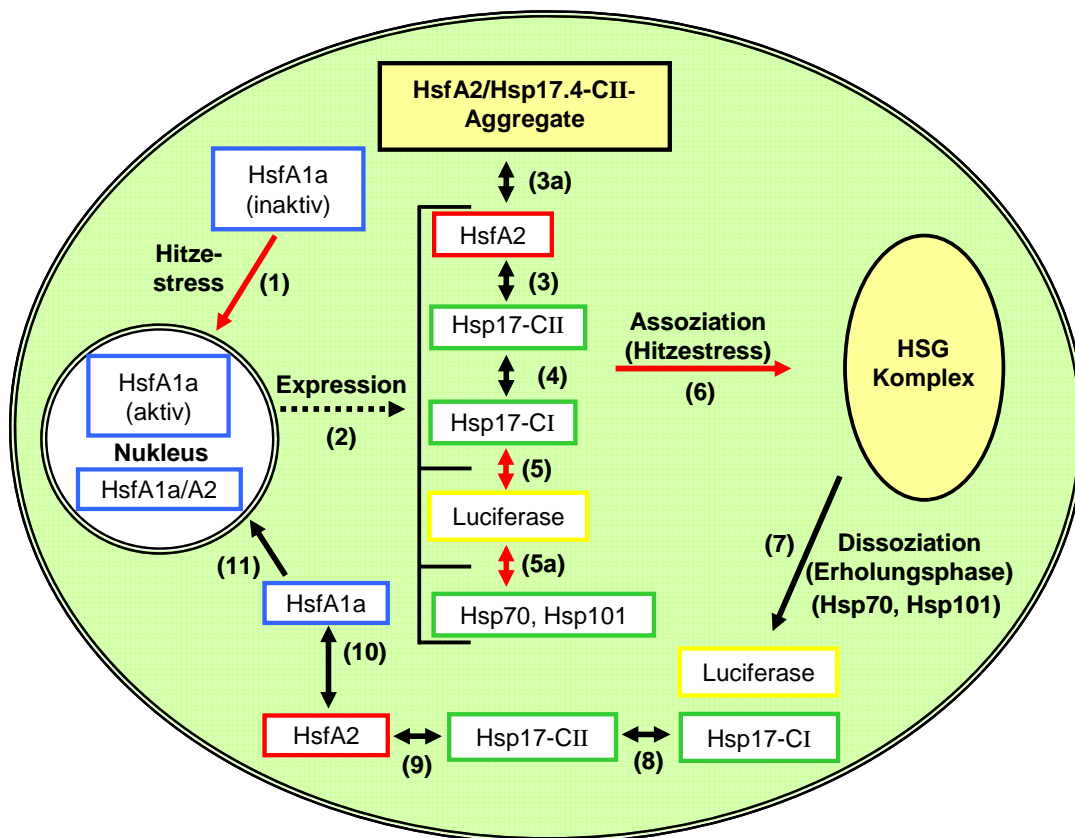
HsfA2 stellt aufgrund seines hohen Aktivatorpotentials und seiner fortgesetzten Akkumulation nach wiederholten Zyklen von Hitzestress und Erholungsphasen den dominanten Hsf unter Hitzestress dar. Dementsprechend ist er in ein Netzwerk interagierender Proteine integriert, die seine intrazelluläre Lokalisation und Aktivität kontrollieren (Heerklotz et al., 2001; Port et al., 2004). Die Überexpression von HsfA2 in CS-Protoplasten führte zu einer Expression von hitzestressinduzierbaren Genen, zu

einer Wiederherstellung der Thermotoleranz sowie der Bildung cytoplasmatischer HSG-Komplexe. HsfA2 erwies sich dabei als unerwartet effektiv, wenn man bedenkt, dass die starke NES am C-Terminus des Proteins eine starke Kernlokalisation verhindern sollte, wenn HsfA2 nicht als Heterooligomer mit HsfA1 vorliegt (Heerklotz et al., 2001). Möglicherweise interagiert HsfA2 mit anderen Hsf der Klasse A, die zwar in der Lage sind, HsfA2 im Kern zurückzuhalten, nicht aber dessen Funktion in der induzierten Thermotoleranz erfüllen können. Interessanterweise beeinträchtigt auch der *knock-down* von HsfA2 die Protektion der Luciferase nach einem Hitzestress, und in geringerem Ausmaß auch deren Rückfaltung, obwohl die Expression von Hsp17-CI nicht beeinflusst wurde (Abb. 12). Möglicherweise reguliert HsfA2 andere, bislang unbekannte Faktoren, die bei der Ausprägung von Thermotoleranz eine Rolle spielen. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass HsfA2 als Teil der HSG-Komplexe selbst an der Ausprägung von Thermotoleranz beteiligt ist.

Die Regulation von Hsf durch Corepressoren ist bereits anhand einiger Beispiele beschrieben worden: So maskiert das Hsf-Bindeprotein HSBP1 in Säugetieren und Nematoden die HR-A/B-Region und stabilisiert so die inaktive, monomere Form der Hsf (Satyal et al., 1998; Tai et al., 2002). Ein orthologes Protein zu HSBP1 konnte in Mais identifiziert werden. Das Fehlen dieses Proteins in der Mutante *empty pericarp 2* führte zur unkontrollierten Expression von Hsp und zum Absterben der Embryonen (Fu et al., 2002). Auch die Beteiligung von Hsp70 und Hsp90 an der Regulation von Hsf ist anhand mehrerer Beispiele in Hefe und Vertebraten belegt worden (Baler et al., 1996; Nair et al., 1996; Ali et al., 1998; Shi et al., 1998; Bharadwaj et al., 1999; Bonner et al., 2000; Guo et al., 2001). Hsp70 könnte in Pflanzen eine ähnliche Funktion als Coregulator der Hsf-Aktivität ausüben (Lee und Schöffl, 1996; Kim und Schöffl, 2002).

In Tomatenzellkultur liegt HsfA2 in drei Formen vor (Scharf et al., 1998; Heerklotz et al., 2001): (1) In Gegenwart von HsfA1 ist HsfA2 trotz seiner starken NES im Zellkern zu finden, möglicherweise in Form eines HsfA2/HsfA1-Heterooligomers. (2) Nach andauerndem Hitzestress wird HsfA2 zusammen mit Hsp17-CI und Hsp17-CII in die cytoplasmatischen HSG-Komplexe inkorporiert. (3) Die Bindung von HsfA2 an die HSG-Komplexe ist reversibel: In der Erholungsphase nach dem Hitzestress findet sich ein Großteil von HsfA2 in löslicher Form im Cytoplasma. Die sHsps der Klassen CI und CII, die infolge hitzestressinduzierter Genexpression zusammen mit HsfA2 gebildet werden, spielen völlig unterschiedliche Rollen in der Regulation der intrazellulären

Verteilung und Aktivität von HsfA2. Hsp17.4-CII fungiert als Repressor der Aktivität von HsfA2 (Port et al., 2004) und bewirkt die Bildung hochmolekularer Aggregate von Hsp17.4-CII und HsfA2 sogar unter Kontrollbedingungen (siehe Abb. 20). Diese Aggregation stellt zwar ein Artefakt dar, das allerdings hilft, Details der Regulation der intrazellulären Lokalisation und Funktion zu verstehen. Im Gegensatz zur eher unspezifischen Interaktion von Klasse CI-Proteinen mit Klasse CII-Proteinen ist die Interaktion zwischen HsfA2 und Hsp17.4-CII hoch selektiv. Selbst mit dem nahe verwandten Protein Hsp17.3-CII findet keine Interaktion statt. Ein einzelner Aminosäureaustausch (V48>A) stellt den entscheidenden Unterschied zwischen den beiden Proteinen dar, und führt zu einem Verlust der Interaktion (Port et al., 2004, Abb. 22). Ein weiterer Hinweis auf die funktionellen Unterschiede der beiden Isoformen der Klasse CII ergibt sich, wenn man die Hsf-induzierten Expressionsmuster der Proteine betrachtet (Abb. 9). Es zeigt sich, dass HsfA2 im Gegensatz zu HsfA3 und HsfA4b hauptsächlich die Expression der nicht-interagierenden Isoform Hsp17.6-CII bewirkt. Beide Isoformen werden also unterschiedlich reguliert. Einen zusätzlichen Kontrollmechanismus könnte eine Modifizierung von Hsp17.4-CII darstellen. Es gibt Hinweise, dass Hsp17.4-CII in einer modifizierten Form vorliegt, möglicherweise handelt es sich dabei um Phosphorylierung (Abb. 9). Die Größe der Oligomere und die Chaperonaktivität von Hsp27 und  $\alpha$ B-Crystallin aus Säugern wird beispielsweise durch Phosphorylierung reguliert (Rogalla et al., 1999; Ito et al., 2001). Ob eine Phosphorylierung von Hsp17.4-CII stattfindet und ob dies funktionelle Konsequenzen für die Interaktion mit HsfA2 hat, muss noch geklärt werden.



**Abb. 23: Modell zur Funktion einzelner Komponenten des pflanzlichen Chaperonnetzwerkes.**

Der Hauptregulator der pflanzlichen Hitzestressantwort, HsfA1, wird nach einem Hitzestress aktiviert (1) und kontrolliert die Expression von Hsp, wie Hsp17-CI und CII, Hsp70 und Hsp101, sowie HsfA2. Die Interaktion zwischen HsfA2 und Hsp17-CII (3) kann zur Bildung unlöslicher Aggregate unter Kontrollbedingungen führen (3a), die durch Hsp17-CI wiederaufgelöst werden können (4). Hsp17-CI (5) sowie Hsp70 (5a) schützen unter Hitzestress Proteine vor der Denaturierung, und Hsp70 sowie Hsp101 (5a) ermöglichen deren Renaturierung, wie hier am Beispiel Luciferase gezeigt. Nach Einwirkung eines Hitzestresses werden weiterhin große, cytoplasmatische Chaperonkomplexe (HSG-Komplexe) gebildet (6). Diese enthalten Hsp17-CI und -CII, Hsp70, HsfA2 sowie denaturierte Proteine. Die Resolubilisierung von HsfA2 und die Rückfaltung denaturierter Proteine wie Luciferase setzt die Beteiligung der ATP-abhängigen Hsp70- und Hsp101-Chaperonmaschinen voraus (7). Die Kernretention von HsfA2 hängt von seiner Löslichkeit (8, 9) und der Bildung von Heterooligomeren mit HsfA1 (10, 11) ab.

Mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenz konnte ich zeigen, dass Hsp17-CI mit Hsp17.4-CII interagiert und dessen Coaggregation mit HsfA2 verhindert (Abb. 20). In Tomatenzellen kann in der Erholungsphase nach einem Hitzestress keine Aggregation von endogenem HsfA2 beobachtet werden. Möglicherweise wird hier HsfA2 durch Hsp17.4-CII in einer inaktiven Form stabilisiert, bleibt aber infolge der Anwesenheit von Hsp17-CI löslich und für eine schnelle Aktivierung verfügbar.

Der solubilisierende Effekt von Hsp17-CI unter Kontrollbedingungen reflektiert die Interaktion zwischen Hsp17.4-CII und Hsp17-CI in ihrer oligomeren Form nach Coexpression in Pflanzenzellen. Die Interaktion von Hsp17-CI mit Proteinen der Klasse CII konnte auf Oligomerebene anhand der Größenveränderung von Hsp-Komplexen im nativen Gel (vgl. Abb. 16B und Abb. 19) dargestellt werden. Diese Ergebnisse in Pflanzenzellen stehen im Widerspruch zu früheren Ergebnissen im Hefe-Zwei-Hybrid-System, wo keine Interaktion zwischen sHsp der Klassen CI und CII festgestellt werden konnte. Dies ist wohl darauf zurückzuführen, dass im Hefe-Zwei-Hybrid-System nur eine Interaktion auf Dimer-Ebene stattfinden kann, und die Dimer-Grenzflächen verschiedener Klassen inkompatibel sind (Kirschner et al., 2000).

Neben den Faktoren, deren Einfluss auf HsfA2 hier diskutiert wurde, spielen wahrscheinlich noch andere Proteine eine Rolle in dem Proteinnetzwerk, das HsfA2 kontrolliert. Mittels der für die dargestellten Experimente verwendeten Coexpression in Tomaten- bzw. Tabakmesophyllprotoplasten kann natürlich die native Situation in Tomatenzellen nur simuliert werden. Für weitere Experimente bietet sich die Verwendung der RNAi-Technologie in Tomatenprotoplasten an, die einen selektiven *knock-down* der Expression der hier dargestellten und anderen möglichen Interaktionspartnern erlaubt.



## 5 Zusammenfassung

Die Hitzestressantwort stellt einen universellen Schutzmechanismus aller lebenden Organismen dar. Infolge einer Temperaturerhöhung werden Hitzestresstranskriptionsfaktoren (Hsf) aktiviert und bewirken eine gesteigerte Expression von Hitzestressproteinen (Hsp). Als molekulare Chaperone schützen diese die Zelle vor durch Hitze verursachten Schäden. In höheren Pflanzen ist dieses Phänomen sowohl auf der Ebene der Hsf als auch der Hsp besonders komplex. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Funktion von Komponenten des Chaperonsystems in der pflanzlichen Thermotoleranz. Zur Untersuchung der Thermotoleranz wurde ein transientes Expressionssystem mit Mesophyllprotoplasten aus steril angezogenen Tomatenpflanzen (*Lycopersicon esculentum*) zweier Linien (WT und CS) verwendet. CS-Pflanzen zeigen Cosuppression von HsfA1 und zeichnen sich durch eine Integration zweier direkt aufeinander folgender Transgenkassetten in invertierter Orientierung aus. Die fehlende Expression von HsfA1 in CS-Pflanzen ist die Folge eines Prozesses, der als *RNA-interference* (RNAi) bezeichnet wird.

In unserem transienten Expressionssystem wurden Mesophyllprotoplasten mit einem Expressionsplasmid transformiert, das für Luciferase aus *Photinus pyralis* als thermosensitivem, leicht nachweisbarem Reporterprotein kodiert. Mit Hilfe dieses Testsystems konnten wir den Schutz der Luciferase gegen eine thermische Denaturierung bei 41°C (30 min) und die nachfolgende Renaturierung für 120 min bei 25°C in Abhängigkeit von endogenen und transient exprimierten Hsp und Hsf beobachten. Mit Hilfe der RNAi-Technologie und unter Verwendung von genspezifischen *inverted repeat*-Konstrukten konnten wir weiterhin die Bildung einzelner Komponenten des endogenen Chaperonsystems verhindern und damit ihre Funktion untersuchen.

Es zeigte sich, dass in Protoplasten aus CS-Pflanzen praktisch alle hitzestressinduzierten Proteine fehlten und diese nicht in der Lage waren, Thermotoleranz auszuprägen, wie unter Verwendung des Reporterproteins Luciferase nachgewiesen werden konnte. Weiterhin fand keine Bildung cytoplasmatischer Multichaperonkomplexe, der sogenannten Hitzestressgranula (HSG), statt. Dieser Defekt in der Ausprägung von Thermotoleranz konnte durch Expression von HsfA2,

HsfA3 und HsfA4b repariert werden. Die Überexpression dieser Hsf führte gleichermaßen zu (1) einer Expression von Chaperonen, (2) Thermoprotektion des Reporterenzym *Photinus pyralis*-Luciferase und (3) Bildung von HSG-Komplexen. In weiteren Analysen lag unser Augenmerk insbesondere auf Vertretern der sHsp, sowie der Hsp70- und Hsp101-Chaperonfamilien. Hierbei erwies sich, dass vor allem Klasse CI-sHsp und Vertreter der Hsp70-Familie beim Schutz der Luciferase gegen Denaturierung während eines Hitzstresses eine Rolle spielen, während hauptsächlich Hsp101 und Vertreter der Hsp70-Familie in der darauf folgenden Erholungsphase von Bedeutung sind.

Die Untersuchung der Interaktionen von drei Klassen cytoplasmatischer sHsp und ihrer intrazellulären Verteilung im Rahmen meiner Arbeit zeigte, dass jeder dieser Klassen eine unterschiedliche Funktion im Netzwerk cytoplasmatischer sHsp zukommt. Unter Verwendung nativer Gelelektrophorese und indirekter Immunfluoreszenz konnte nachgewiesen werden, dass sHsp der Klassen CI, CII und CIII in der Lage sind, auf der Ebene oligomerer Komplexe zu interagieren und ihre intrazelluläre Lokalisation wechselseitig zu beeinflussen. Proteine der Klasse CII zeigten eine starke Tendenz zur Bildung von Aggregaten, in die Klasse CIII-sHsp rekrutiert wurden. Im Unterschied dazu verfügten Klasse CI-Proteine über die Fähigkeit, diese Aggregate aufzulösen. Die detaillierte Untersuchung von fünf Isoformen der Klasse CI und zwei Isoformen der Klasse CII aus *Lycopersicon esculentum* ergab, dass diese oligomere Komplexe einer unterschiedlichen Anzahl von Untereinheiten bilden. Nach Coexpression waren Proteine beider Klassen in heterooligomeren Komplexe zu finden. Allerdings deuteten sich bei der Analyse der Fähigkeit einzelner Isoformen der Klasse CI, Heterooligomere mit Klasse CII-Proteinen zu bilden, Unterschiede an.

sHsp kommt weiterhin eine Funktion in der Kontrolle der Aktivität von HsfA2 zu. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass sHsps der Klassen CI und CII völlig unterschiedliche Rollen in der Regulation der intrazellulären Verteilung von HsfA2 spielen. Nach Überexpression in Mesophyllprotoplasten bildete LpHsp17.4-CII, nicht aber das nahe verwandte LpHsp17.3-CII mit HsfA2 große, cytoplasmatische Aggregate. Hsp17-CI dagegen verhinderte die Coaggregation von Hsp17.4-CII mit HsfA2.

## 6 Literatur

**Alexandrov V.** (1994) Functional aspects of cell response to heat shock. *Int. Rev. Cytol.* **148**: 171–227.

**Ali A., Bharadwaj S., O’Carroll R., and Ovsenek N.** (1998) HSP90 interacts with and regulates the activity of heat shock factor 1 in *Xenopus* oocytes. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 4949–4960.

**Baler R., Zou J., and Voellmy R.** (1996). Evidence for a role of Hsp70 in the regulation of the heat shock response in mammalian cells. *Cell Stress Chaperones* **1**: 33-39.

**Baniwal S.K, Bharti K., Chan K.Y., Fauth M., Ganguli A., Kotak S., Mishra S.K., Nover L., Port M., Scharf K.-D., Tripp J., Weber C., Zielinski D. and von Koskull-Döring P** (2004). Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *J. Biosci.* **29**: 471–487.

**Basha E., Lee G.J., Breci L.A., Hausrath A.C., Buan N.R., Giese K.C., and Vierling E.** (2003). The identity of proteins associated with a small heat shock protein during heat stress in vivo indicates that these chaperones protect a wide range of cellular functions. *J. Biol. Chem.* **279**: 7566-7575.

**Basha E., Lee G.J., Demeler B., and Vierling E.** (2004). Chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from wheat. *Eur. J. Biochem.* **271**: 1426-1436.

**Baulcombe D.** (2004). RNA silencing in plants. *Nature* **431**: 356-363.

**Bharadwaj S., Ali A., and Ovsenek N.** (1999) Multiple components of the HSP90 chaperone complex function in regulation of heat shock factor 1 in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 8033–8041.

- Bharti K., Schmidt E., Lyck R., Bublak D., and Scharf K.D.** (2000) Isolation and characterization of HsfA3, a new heat stress transcription factor of *Lycopersicon peruvianum*. *Plant J.* **22**: 355–365.
- Bharti K., von Koskull-Döring P., Bharti S., Kumar P., Tintschl-Körbitzer A., Treuter E., and Nover L.** (2004) Tomato heat stress transcription factor HsfB1 represents a novel type of general transcription coactivator with a histone-like motif interacting with the plant CREB binding protein ortholog HAC1. *Plant Cell* **16**: 1521–1535.
- Bonner J.J., Carlson T., Fackenthal D.L., Paddock D., Storey K., and Lea K.** (2000) Complex regulation of the yeast heat shock transcription factor. *Mol. Biol. Cell* **11**: 1739–1751.
- Bova M.P., McHaourab H.S., Han Y., and Fung B.K.** (2000). Subunit exchange of small heat shock proteins. Analysis of oligomer formation of alphaA-crystallin and Hsp27 by fluorescence resonance energy transfer and site-directed truncations. *J. Biol. Chem.* **275**: 1035-1072.
- Chen, Q., Osteryoung, K., and Vierling, E.** (1994) A 21-kDa chloroplast heat shock protein assembles into high molecular weight complexes in vivo and in organelle. *J. Biol. Chem.* **269**, 13216-13223.
- Coca M.A., Almoguera C., and Jordano J.** (1994). Expression of sunflower low-molecular-weight heat-shock proteins during embryogenesis and persistence after germination: localization and possible functional implications. *Plant Mol. Biol.* **3**: 479-92.
- Conti E., Franks N.P., and Brick P.** (1996). Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure* **4**: 287-298.

- Demand, J., Lüders, J., and Höhfeld, J.** (1998). The carboxy-terminal domain of Hsc70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 2023-2028.
- DeRocher A.E., Helm K.W., Lauzon L.M., and Vierling E.** (1991). Expression of a conserved family of cytoplasmic low molecular weight heat shock proteins during heat stress and recovery. *Plant Physiol.* **96**: 1038-1047.
- Dewey W.C.** (1989). The search for critical cellular targets damaged by heat. *Radiat. Res.* **120**: 191–204.
- Döring P., Treuter E., Kistner C., Lyck R., Chen A., and Nover L.** (2000). Role of AHA motifs for the activator function of tomato heat stress transcription factors HsfA1 and HsfA2. *Plant Cell* **12**: 265-278.
- Ehrnsperger M., Gräbner S., Gaestel M., and Buchner J.** (1997). Binding of non-native protein to Hsp 25 creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J.* **16**: 221-229.
- Ehrnsperger M., Lilie H., Gaestel M., and Buchner J.** (1999). The dynamics of Hsp25 quarternary structure. *J. Biol. Chem.* **274**: 14867-14874.
- Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., and Tuschl T.** (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**:494-498.
- Feil I.K., Malfois M., Hendle J., van Der Zandt H., and Svergun D.I.** (2001). A novel quaternary structure of the dimeric alpha-crystallin domain with chaperone-like activity. *J. Biol. Chem.* **276**:12024-12029.
- Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., and Mello C.C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806–811.

- Fontaine J.M., Rest J.S., Welsh M.J., and Benndorf R.** (2003). The sperm outer dense fiber protein is the 10th member of the superfamily of mammalian small stress proteins. *Cell Stress Chap.* **1**: 62-69.
- Forreiter C., Kirschner M., and Nover L.** (1997). Stable transformation of an Arabidopsis cell suspension culture with firefly luciferase providing a cellular system for analysis of chaperone activity in vivo. *Plant Cell* **9**: 2171-2181.
- Forreiter C. and Nover L.** (1998). Heat induced stress proteins and the concept of molecular chaperones. *J. Biosci.* **23**: 287-302.
- Freeman B.C., Myers M.P., Schumacher R., Morimoto R.I.** (1995) Identification of a regulatory motif in Hsp70 that affects ATPase activity, substrate binding and interaction with HDJ-1. *EMBO J.* **14**: 2281–2292.
- Fu S., Meeley R., and Scanlon M.J.** (2002) Empty pericarp2 encodes a negative regulator of the heat shock response and is required for maize embryogenesis. *Plant Cell* **14**: 3119–3132.
- Giese K.C. and Vierling E.** (2004). Mutants in a small heat shock protein that affect the oligomeric state. Analysis and allele-specific suppression. *J. Biol. Chem.* **279**: 32674-83.
- Glover J.R. and Lindquist S.** (1998). Hsp 104, Hsp 70, and Hsp 40: A novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* **94**: 73-82.
- Guo Y.L., Guettouche T., Fenna M., Boellmann F., Pratt W.B., Toft D.O., Smith D.F., Voellmy R.** (2001) Evidence for a mechanism of repression of heat shock factor 1 transcriptional activity by a multichaperone complex. *J. Biol. Chem.* **276**: 45791–45799.
- Hanahan D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.

- Hartl F.-U. and Hayer-Hartl M.** (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **295**: 1852-1858.
- Haslbeck M., Braun N., Stromer T., Richter B., Model N., Weinkauff S., Buchner J.** (2004). Hsp42 is the general small heat shock protein in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **23**: 638-649.
- Haslbeck M., Walke S., Stromer T., Ehrnsperger M., White H.E., Chen S., Saibil H.R., and Buchner J.** (1999). Hsp 26: A temperature-regulated chaperone. *EMBO J.* **18**: 6744-6751.
- Heerklotz D., Döring P., Bonzelius F., Winkelhaus S., and Nover L.** (2001). The balance of nuclear import and export determines the intracellular distribution of tomato heat stress transcription factor HsfA2. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 1759-1768.
- Höhfeld, J. and Jentsch, S.** (1997). GrpE-like regulation of the HSC70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1. *EMBO J.* **16**: 6209-6216.
- Höhfeld, J., Minami, Y., and Hartl, F.-U.** (1995): Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc 70/ Hsp 40 reaction cycle. *Cell* **83**: 589-598.
- Hong S.-W., Lee U., and Vierling E.** (2003). Arabidopsis hot Mutants Define Multiple Functions Required for Acclimation to High Temperatures. *Plant Phys.* **132**: 757-767.
- Hong S.W. and Vierling E.** (2001). Hsp101 is necessary for heat tolerance but dispensable for development and germination in the absence of stress. *Plant J.* **27**: 25-35.
- Horwitz J., Bova M.P., Ding L.L., Haley D.A., and Stewart P.L.** (1999): Lens alpha-crystallin: function and structure. *Eye* **13**: 403-408.
- Ito H., Kamei K., Iwamoto I., Inaguma Y., Nohara D., and Kato K.** (2001): Phosphorylation-induced change of the oligomerization state of alpha B-crystallin. *J. Biol. Chem.* **276**: 5346-5352.

- Jinn T.L., Chen Y.M., and Lin C.Y.** (1995). Characterization and Physiological Function of Class I Low-Molecular-Mass, Heat-Shock Protein Complex in Soybean. *Plant Phys.* **108**: 693-701.
- Johnson, B.D, Schumacher, R.J., Ross, E.D., and Toft, D.O.** (1998). Hop modulates hsp 70/ hsp 90 interactions in protein folding. *J. Biol. Chem.* **273**: 3679-3686.
- Kedersha N. and Anderson P.** (2002). Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem. Soc. Trans.* **30**: 963-969.
- Kim K.K.K., Kim R., and Kim S.-H.** (1998). Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature* **394**: 595-599.
- Kim R., Lai L., Lee H. H., Cheong G. W., Kim K. K., Wu Z., Yokota H., Marqusee S., and Kim S. H.** (2003). On the mechanism of chaperone activity of the small heat-shock protein of *Methanococcus jannaschii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**: 8151–8155.
- Kim B.H. and Schöffl F.** (2002) Interaction between *Arabidopsis* heat shock transcription factor 1 and 70 kDa heat shock proteins. *J. Exp. Bot.* **53**: 371–375
- Kimpel J.A., and Key J.** (1985). Heat shock in plants. *Trends Biochem. Sci.* **10**: 353-357.
- Kirschner M., Winkelhaus S., Thierfelder J. and Nover L.** (2000). Transient expression and heat stress induced co-aggregation of endogenous and heterologous small eat stress proteins in tobacco protoplasts. *The Plant Journal* **24**: 397-411.
- Kotak S., Port M., Ganguli A., Bicker F., and von Koskull-Döring P.** (2004). Characterization of C-terminal domains of *Arabidopsis* heat stress transcription factors (Hsfs) and identification of a new signature combination of plant class A



Hsfs with AHA and NES motifs essential for activator function and intracellular localization. *The Plant Journal* **39**: 98-112.

**Lee G.J., Pokala N., and Vierling E.** (1995). Structure and *in vitro* molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. *J. Biol. Chem.* **270**: 10432-10438.

**Lee G.J., Roseman A., Saibil H.R., and Vierling E.** (1997). A small heat shock protein stably binds heat denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *EMBO J.* **16**: 659-671.

**Lee J.H. and Schöffl F.** (1996). An Hsp70 antisense gene affects the expression of HSP70/HSC70, the regulation of HSF, and the acquisition of thermotolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **252**: 11-19.

**Lee G.J. and Vierling E.** (2000). A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Phys.* **122**: 189-197.

**Löw, D., Brändle, K., Nover, L. and Forreiter, C.** (2000). Cytosolic heat stress proteins Hsp17.7 class I and Hsp17.3 class II of tomato act as molecular chaperones *in vivo*. *Planta* **211**: 575–582.

**Lund A.A., Rhoads D.M., Lund A.L., Cerny R.L., Elthon T.E.** (2001). *In vivo* modifications of the maize mitochondrial small heat stress protein, HSP22. *J. Biol. Chem.* **276**: 29924-29929.

**Lyck R.** (1998). Identifikation der Kerntransportsequenzen von zwei pflanzlichen Hitzestresstranskriptionsfaktoren und Untersuchungen zu deren funktioneller und physikalischer Interaktion. Dissertation im Arbeitskreis Molekulare Zellbiologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.

- Lyck R., Harmening U., Höhfeld I., Scharf K.D., and Nover L.** (1997). Intracellular distribution and identification of the nuclear localization signals of two tomato heat stress transcription factors. *Planta* **202**: 117-125.
- Malik M.K., Slovin J.P., Hwan C.H., and Zimmerman J.L.** (1999). Modified expression of a carrot small heat shock protein gene, Hsp17.7, results in increased or decreased thermotolerance. *Plant J* **20**: 89–99.
- Mello C.C. and Conte D. Jr.** (2004). Revealing the world of RNA interference. *Nature* **431**: 338-342.
- Merck K.B., Groenen P.J., Voorter C.E., de Haard-Hoekman W.A., Horwitz J., Bloemendal H., and de Jong W.W.** (1993). Structural and functional similarities of bovine alpha-crystallin and mouse small heat-shock protein. A family of chaperones. *J. Biol. Chem.* **268**: 1046-1052.
- Merck K.B., Horwitz J., Kersten M., Overkamp P., Gaestel M., Bloemendal H., and deJong W.W.** (1993). Comparison of the homologous carboxy-terminal domain and tail of alpha-crystallin and small heat shock protein. *Mol. Biol. Rep.* **18**: 209-215.
- Michels A.A., Kanon B., Konings A.W., Ohtsuka K., Bensaude O., and Kampinga H.H.** (1997) Hsp70 and Hsp40 chaperone activities in the cytoplasm and the nucleus of mammalian cells. *J Biol Chem.* **272**: 33283-33289.
- Minami Y., Höhfeld J., Ohtsuka K., and Hartl F.-U.** (1996). Regulation of the heat shock protein 70 reaction cycle by the mammalian DnaJ Homolog, Hsp 40. *J. Biol. Chem.* **271**: 19617-19624.
- Mishra S. K.** (2003). Tomato heat stress transcription factor HsfA1 as master regulator of thermotolerance. Dissertation im Arbeitskreis Molekulare Zellbiologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.

- Mishra S.K., Tripp J., Winkelhaus S., Tschiersch B., Theres K., Nover L., and Scharf K.-D.** (2002). In the complex family of heat stress transcription factors HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. *Genes Dev.* **16**:1555-1565.
- Mogk A., Schlieker C., Friedrich K. L., Schönfeld H.-J., Vierling E., and Bukau B.** (2003). Refolding of Substrates Bound to Small Hsps Relies on a Disaggregation Reaction Mediated Most Efficiently by ClpB/DnaK. *J. Biol. Chem.* **278**: 31033-31042.
- Mogk A., Tomoyasu T., Goloubinoff P., Rüdiger S., Röder D., Langen H., Bukau B.** (1999) Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *EMBO J.* **18**: 6934–6949.
- Murashige T. and Skoog F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* **15**: 473-497.
- Nair S.C., Toran E.J., Rimerman R.A., Hjermstad S., Smithgall T.E., and Smith D.F.** (1996). A pathway of multi-chaperone interactions common to diverse regulatory proteins: estrogen receptor, Fes tyrosine kinase, heat shock transcription factor Hsf1, and the aryl hydrocarbon receptor. *Cell Stress Chaperones* **1**: 237-50.
- Nimmesgern E. and Hartl F.U.** (1993). ATP-dependent protein refolding activity in reticulocyte lysate. Evidence for the participation of different chaperone components. *FEBS Lett.* **331**: 25-30.
- Narberhaus F.** (2002).  $\alpha$ -crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**. 64-93.
- Neumann, D., zur Nieden, U., Manteuffel, R., Walter, G., Scharf, K.-D., and Nover, L.** (1987). Intracellular localization of heat shock proteins in tomato cells cultures. *Eur. J. Cell Biol.* **43**: 71–81.

**Nollen E.A., Kabakov A.E., Brunsting J.F., Kanon B., Hohfeld J., and Kampinga H.H. (2001).** Modulation of in vivo HSP70 chaperone activity by Hip and Bag-1. *J. Biol. Chem.* **276**: 4677-4682.

**Nover L. (Ed.) (1991).** Heat shock response. CRC Press, Boca Raton.

**Nover L., Bharti K., Döring P., Mishra S., Ganguli A and Scharf K-D (2001)** Arabidopsis and the Hsf world: How many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chap* **6**: 177-189.

**Nover L. and Scharf K.-D. (1997).** Heat stress proteins and transcription factors. *Cell. Mol. Life Sci.* **53**: 80-103.

**Nover L., Scharf K.-D., and Neumann D. (1983).** Formation of cytoplasmic heat shock granules in tomato cell cultures and leaves. *Mol. Cell. Biol.* **3**: 1648-1655.

**Nover L., Scharf K.-D., and Neumann D. (1989).** Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 1298-1308.

**Parsell D.A. and Lindquist S. (1993).** The function of heat shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of proteins. *Annu. Rev. Genet.* **27**: 437–496.

**Port M., Tripp J., Zielinski D., Weber C., Heerklotz D., Winkelhaus S., Bublak D. and Scharf K.-D. (2004).** Role of Hsp17.4-CII as coregulator and cytoplasmic retention factor of tomato heatstress transcription factor HsfA2. *Plant Physiol.* **135**: 1457–1470.

**Queitsch C., Hong S.-W., Vierling E., and Lindquist S. (2000).** Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* **12**: 479-492.

- Reichel C., Mathur J., Eckes P., Langenkemper K., Koncz C., Schell J., Reiss B., and Maas C.** (1996). Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequora victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 5888-5893.
- Rogalla T., Ehrnsperger M., Preville X., Kotlyarov A., Lutsch G., Ducasse C., Paul C., Wieske M., Arrigo A.P., Buchner J., and Gaestel M.** (1999). Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **274**: 18947-18956.
- Rojas A., Almoguera C., and Jordano J.** (1999). Transcriptional activation of a heat shock gene promoter in sunflower embryos: synergism between ABI3 and heat shock factors. *Plant J.* **20**: 601-610.
- Sambrook J. and Russell D. W.** (2000). *Molecular cloning. A laboratory manual.* 3<sup>rd</sup> Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.
- Satyal S.H., Chen D., Fox S.G., Kramer J.M., and Morimoto R.I.** (1998) Negative regulation of the heat shock transcriptional response by HSBP1. *Genes Dev* **12**: 1962–1974.
- Scharf K.-D., Heider H., Höhfeld I., Lyck R., Schmidt E., and Nover L.** (1998). The tomato Hsf system: HsfA2 needs interaction with HsfA1 for efficient nuclear import and may be localized in cytoplasmic heat stress granules. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 2240-2251.
- Scharf K.-D., Siddique M. and Vierling E.** (2001). The expanding family of *Arabidopsis thaliana* small heat stress proteins (sHsps) and a new family of proteins containing a-crystallin domains (Acd proteins). *Cell Stress Chap.* **6**. 225-237.

- Schirmer E.C., Glover J.R., Singer M.A., and Lindquist S.** (1996). HSP 100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem Sci.* **21**: 289-96.
- Schumacher R.J., Hansen W.J., Freeman B.C., Alnemri E., Litwack G., and Toft D.O.** (1996) Cooperative action of Hsp70, Hsp90, and DnaJ proteins in protein renaturation. *Biochemistry* **35**: 14889–14898.
- Schumacher RJ, Hurst R, Sullivan W.P., McMahon N.J., Toft D.O., and Matts R.L.** (1994) ATP-dependent chaperoning activity of reticulocyte lysate. *J Biol Chem* **269**: 9493–9499.
- Sherf B.A. and Wood K.V.** (1994). Firefly luciferase engineered for improved genetic reporting. *Promega notes* **49**: 14.
- Shi Y., Mosser D.D., and Morimoto R.I.** (1998) Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev* **12**: 654–666.
- Siddique M., Port M., Tripp J., Weber C., Zielinski D., Calligaris R., Winkelhaus S., and Scharf K.D.** (2003) Tomato heat stress protein Hsp16.1-CIII represents a member of a new class of nucleocytoplasmic small heat stress proteins in plants. *Cell Stress Chaperones* **8**: 381–394.
- Sobott F., Benesch J.L., Vierling E., and Robinson C.V.** (2002). Subunit exchange of multimeric protein complexes. Real-time monitoring of subunit exchange between small heat shock proteins by using electrospray mass spectrometry. *J.Biol.Chem.* **277**: 38921-38929.
- Süß K.H. and Yordanov** (1986). Biosynthetic cause of in vivo acquired thermotolerance of photosynthetic light reactions and metabolic responses of chloroplasts to heat stress. *Plant Physiol.* **81**: 192-199.
- Sun T.X. and Liang J.J.N.** (1998). Intermolecular exchange and stabilization of recombinant human  $\alpha$ A and  $\alpha$ B-Crystallins. *J. Biol. Chem.* **273**: 286-290.

- Sun W., Bernard C., van de Cotte B., Van Montagu M. and Verbruggen N. (2001).** At-HSP17.6A, encoding a small heat-shock protein in Arabidopsis, can enhance osmotolerance upon overexpression. *The Plant Journal* **27**: 407-415.
- Sung D.Y. and Guy C.L. (2003).** Physiological and molecular assessment of altered expression of Hsc70-1 in Arabidopsis. Evidence for pleiotropic consequences. *Plant Physiol.* **132**: 979-987.
- Tai L.J., McFall S.M., Huang K., Demeler B., Fox S.G., Brubaker K., Radhakrishnan I., and Morimoto R.I. (2002)** Structure-function analysis of the heat shock factor-binding protein reveals a protein composed solely of a highly conserved and dynamic coiled-coil trimerization domain. *J Biol Chem* **277**: 735–745.
- Töpfer R., Schell J., and Steinbiss H.H. (1988).** Versatile cloning vectors for transient gene expression and direct gene transfer in plant cells. *Nucleic Acids Res.* **16**: 8725.
- Treuter, E., Nover, L., Ohme, K., and Scharf, K.-D. (1993).** Promoter specificity and deletion analysis of three heat stress transcription factors of tomato. *Mol. Gen. Genet.* **240**: 113–125.
- van Montfort R.L., Basha E., Friedrich K.L., Slingsby C., and Vierling E. (2001).** Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nat Struct Biol.* **8**: 1025-1030.
- Vierling E. (1991).** The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**: 579–620.
- Walter S. and Buchner J. (2002).** Molecular chaperones – Cellular machines for protein folding. *Angew. Chem.-Int. Edit.* **41**: 1098–1113.

- Waters E.R., Lee G.J., and Vierling E.** (1996). Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J. Exp. Bot.* **47**: 325-338.
- Wehmeyer N., Hernandez L.D., Finkelstein R.R., and Vierling E.** (1996). Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. *Plant Physiol.* **112**: 747-757.
- Wehmeyer N. and Vierling E.** (2000). The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. *Plant Physiol.* **122**: 1099-1108.
- Zolkiewski M.** (1999). ClpB Cooperates with DnaK, DnaJ, and GrpE in suppressing protein aggregation. *J. Biol. Chem.* **274**: 28083-28088.



## 7 Anhang

**Tab. 5: Übersicht über die in der Immunoblot-Analyse und der Immunfluoreszenz verwendeten Primär- und Sekundärantiseren.**

Primärantiseren					
Antiserum	Beschreibung	Herkunftsorganismus	Verdünnung (Immunoblot)	Verdünnung (Immunfluoreszenz)	Hersteller
$\alpha$ -17-CI (SA132)	$\alpha$ -LpHsp17.7A-CI	Meerschweinchen	1:5000	1:700	AK Nover (Eurogentec)
$\alpha$ -17-CI (pep)	Peptide MSLIPRFFGGRRSNI (N-Terminus) und EKKKSEVKAIDISG (C-Terminus)	Kaninchen	1:2000	-	AK Nover (Eurogentec)
$\alpha$ -17-CII (SA133)	$\alpha$ -LpHsp17.4A-CII	Meerschweinchen	1:5000	1:500	AK Nover (Eurogentec)
$\alpha$ -Hsp 70 (Spa820)	$\alpha$ -Hsp70	Maus	1:10.000	-	Stressgene Biomol
$\alpha$ -Luciferase	$\alpha$ - <i>Photinus pyralis</i> -Luciferase	Kaninchen	1:10000	1:700	Sigma
$\alpha$ -HsfA3	LpHsfA3	Maus		1:500	B. Margulis, St. Petersburg
$\alpha$ -HsfA1	$\alpha$ -8HN (LpHsfA1)	Kaninchen	1:10000	1:500	AK Nover (Eurogentec)
$\alpha$ -HsfA2	$\alpha$ -30HN (LpHsfA2)	Kaninchen	1:15000	1:500	AK Nover (Eurogentec)
$\alpha$ -HsfA2	$\alpha$ -pep6 (LpHsfA2)	Kaninchen	1:5000	-	AK Nover
$\alpha$ -Myc	$\alpha$ -Myc	Maus	1:2000	1:500	Sigma
$\alpha$ -HA	$\alpha$ -HA	Maus	1:2000	1:500	Sigma
$\alpha$ -Strep	$\alpha$ -Strep	Kaninchen	1:10000	1:700	IBA
Sekundärantiseren					
Antiserum		Verdünnung (Immunoblot)	Verdünnung (Immunfluoreszenz)	Hersteller	
$\alpha$ -Kaninchen-HRP		1:10.000	-	Sigma	
$\alpha$ -Maus-HRP		1:10.000	-	Sigma	
$\alpha$ -Meerschweinchen-HRP		1:5000	-	Sigma	
$\alpha$ -Kaninchen Cy 2-konjugiert		-	1:500	Dianova	
$\alpha$ -Kaninchen Cy 3-konjugiert		-	1:800	Dianova	
$\alpha$ -Meerschweinchen Cy 2-konjugiert		-	1:500	Dianova	
$\alpha$ -Meerschweinchen Cy 3-konjugiert		-	1:800	Dianova	
$\alpha$ -Maus Cy 2-konjugiert		-	1:500	Dianova	
$\alpha$ -Maus Cy 3-konjugiert		-	1:800	Dianova	

Cy2, Carbocyanin; Cy3, Indocarbocyanin; HA, Haemagglutinin-Markierung; HRP, Meerrettich-Peroxidase (*horse raddish peroxidase*); Lp, *Lycopersicon peruvianum*.

Tab. 6: Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Konstrukte.

Name	Protein	Nr.
<b>Reporter</b>		
pRTdS Luciferase (-)	aa 1-550	MK 28
<b>Hsf-Expressionsvektoren</b>		
pRTHsfA1.dC394	aa 23-394+as	ET 325
pRTHsfA2	aa 1-351	ET 345, 403
pRT3HA-HsfA2	3HA (1-34+3 aa)xHsfA2 (aa 21-351)	MH 3
pRTHsfA3(M3)	aa M86-F508	SE 7
pRTdSLeHsfA4b-3HA	aa 1-393x3HA (33 aa)	SB 111
<b>Hsp-Expressionsvektoren</b>		
pRTAtHsp101	aa 1-911	JT20
pRTPsHsp18.1-CI	aa 1-158	MK1
pRTdSLpHsp17.7A-CI	aa 1-154	DLII-2
pRTdSLeHsp17.6-CI	aa 1-154	JT9
pRTdSLeHsp17.7-CI	aa 1-154	JT12
pRTdSLeHsp17.8-CI	aa 1-154	JT10
pRTdSLeHsp18.1-CI	aa 1-160	JT11
pRTdSLeHsp18.2-CI	aa 1-160	JT13
pRTdSLe17.6-CI-Strep	LeHsp17.6-CI (aa 1-154+2 aa)xStrep (8 aa)	JT7
pRTAt17.4-CI-Strep	AtHsp17.4-CI (aa 1-156)xStrep (8aa)	JT22
pRTLpHsp17.3B-CII	aa 1-155	MP7
pRTLpHsp17.4B-CII	aa 1-155	MK29
pRTLLeHsp17.4-CII	aa 1-155	DZ15
pRTLLeHsp17.6-CII	aa 1-155	DZ16
pRT3HA-LpHsp16.1-CIII	3HA (aa 1-34+9 aa)xLpHsp16.1-CIII (aa 1-144)	MS2
<b>inverted repeat-Konstrukte</b>		
pRTLpHsfA1 (IR)		SKM8
pRTLpHsfA2 (IR)		SKM9
pRTLpHsp70 (IR)		SKM10
pRTLLeHsp101 (IR)		SKM11
pRTLLeHsp17.6-CI (IR)		SKM12
pRTLLeHsp17.8-CI (IR)		SKM13
pRTLLeHsp18.1-CI (IR)		SKM14
pRTLLeHsp17-CII (IR)		SKM15
pJawohlLeHsp70-1 (UTR) (IR)		SKM17
pJawohlLeHsp70-3 (UTR) (IR)		SKM18
pRTLLeHsp70-4 (UTR) (IR)		SKM19
pRTLLeHsp70-5 (UTR) (IR)		SKM20
pJawohlLeHsp70-6 (UTR) (IR)		SKM21

aa, Aminosäurereste; At, *Arabidopsis thaliana*; HA, Haemagglutinin-Markierung; IR, *inverted repeat*; Le, *Lycopersicon esculentum*; Lp, *Lycopersicon peruvianum*; Ps, *Pisum sativum*; UTR, *untranslated region*.

**Kodierende Region (C-Terminus)**

```

hsp70-1 : TGTAATCCCATCATTGCAAAGATGTACCAGGGTCTGGTGGT---GACGCAGGTGTTCCCTATGGATGATGATG---CTCCAC-----CATCTGGTGGTAGCAGTGCAGGACCTAAGATTGAGGAGGTTGATTAA
hsp70-2 : TGTAATCCCATAATTGCAAAGATGTACCAGGGTCTGGTGGT---GAGGCAGGTGCACCTATGATGATGATGATGCTCCTC-----CAGCTGGTCTACCAGTGCAGGCCCAAGATTGAGGAGGTCGATTAA
hsp70-3 : TGCAACCCCTATCATTGCAAAAATGTACCAGGAGCAGGTGGT---GACATG-----GATGACGAAAGTCTCTGCTC-----CTAGTGGTGGT---GGTGCCTGGTCTAAGATTGAGGAGGTTGACTAA
hsp70-4 : TGCAATCCCAATTATTGCAAAGATGTACCAGGTCCTGGCGGT---GACATGGGTGCTGACATGGGTGATGATGGCCTGCTC-----CTAGCGGTGGCAGCGGTGCTGGTCTAAGATCGAGGAGGTCGACTAA
hsp70-5 : TGCAACCCCATTTATCGCAAGATGTACCAGGGCGGGCTGGTCTTGCATGGCTGGTGGTATGATGAAGATGGCCTTCAGCT-----GGTGCTAGCAGTGCCTGGTGCAGGCCCTAAGATTGAGGAAGTGGACTAA
hsp70-6 : TGCAATCCGATCATTGCCAAGATGTATCAAGGCTGGTGGT---GGAGCTACTATGGATGAAGATGATGGTCTTCTGTTGGTGGTGGTGAGGAAGTCAAGTGGTGGTGGTCCAAAAATTGAGGAAGTGGATTAA

hsp70-1 : CCGGTTGATAAAGATACTAGTTGGTTTCATTTTCATTAGTATAGTTTAGTAGATTACTTTGAATTGGCTCTTGTTCAGAGTTTGGTGTGTAATTCTTACTGATGTTTTTAAATAGCGATACTGAGTGC-----
hsp70-2 : GTGTGAACAGTTCTAGTTTTATCTCAGTATAAACTATTCTATTATATTGTTACTTTTTATGTTTTCGCTAATCGGTTTCGCTCTATTATTAAAGCTGTTGAATGTTGATGGCTCTTTATATGAGTTCATCGATT
hsp70-3 : CTTTGTGGTTCCTATATTGTTTATTATTAGATACTGTCAATTTTGTCTCAGAGAACTCTATGAATATCTTTTCTTTCTTCAATGAAATACAAATGTTATATGTTGTAGT-----
hsp70-4 : CTTGTTTTCGCTCCTCAATCCCATGTTTTTGGTTTCGTCAGTTAGTTTTATCCCCAAAACTCCATTTTAAAGTTTATCCCCGAAAACTCCATTTTATTATTCCTGCATTGTAGTTTTTATAGTAATGGTGATACTTT
hsp70-5 : GCTCCACATTACCTAGTGTATGGTGAAATCTAGTTCTTGAGTAGTAGAAATAAGATGATGTATAGTTGTAGTTATACGAACCTGTTTTGTGTATGTAGAAATATCCTTCGATATTTACCCAGTCTAATGTTTTTGAG
hsp70-6 : CAATTTTGTAGTGAAATTGTTTACTTGTTCCTACTAAGTATGCTTCAAGTAGCCTTTTGAAATGAAAGCTTGTTCATCCTTTTGTGTGTGATAAAATGTTATGTGCTTTTCAATATATAGAATTGAAGAAAGCTTA

hsp70-1 : -----
hsp70-2 : TTGAATTTTAAATGACTATCCGTTGTTTGGAACTCCTTAGGCTGAAATTGTCTTTACAAGTGCTCTTATCTGGCCTACGACTTTGTATTACTGGTCTATATTTTCCAAGTTAATACGGTGGAAAAGATATTTGAGAAC
hsp70-3 : -----
hsp70-4 : TTGCGTATTTTGGCTTGAACCTTGTATCAAGTATACTATCATTTTTCGAATTCATAATTCAGATTTTGCTAAAAAGCTCGGCTGTACCGTTTGATCTATCTATGCCTTAAATATTCAGTGTTT-----
hsp70-5 : TTCTATGCACTTACCTTCTTATGTACTAGATTACTTCTATATCTTTGATTAATTTCTTTACTCTT-----
hsp70-6 : TGTTGTTCTTATCCTCTACTAAAAACAGTGGTGCAGTTACTT-----

```

**Abb. 24: Klonierung genspezifischer *inverted repeat*-Konstrukte zum spezifischen *knock-down* von Vertretern der Hsp70-Familie.**

Im Sequenzvergleich sind nur die für die Klonierung der *inverted-repeat* (IR)-Konstrukte wichtigen Sequenzbereiche der kodierenden Region und der 3'-UTR dargestellt. Die Bindungsstelle des zur Klonierung verwendeten *forward*-Primers in der kodierenden Region ist blau markiert, die Bindungsstellen der genspezifischen *reverse*-Primer in der 3'-UTR sind rot markiert. Sequenzen sind im TIGR *tomato gene index* (<http://www.tigr.org/tdb/tgi/lgi>) unter folgenden *tentative consensus* (TC)-Nummern erhältlich: hsp70-1 (TC155261); hsp70-2 (TC154318); hsp70-3 (TC156156); hsp70-4 (TC154204); hsp70-5 (TC164785); hsp70-6 (TC155792).

**Tab. 7: Zusammenstellung der im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Konstrukte.**

Nr.	Plasmid	Vektor	Insert	Klonierung und Dokumentation, Daten
JT1	pGEXPsHsp17.1-CII	pGEX 4T3	PsHsp17.1-CII	PCR-Amplifizierung von PsHsp17.1-CII aus pRT PsHsp17.1-CII (Primer 473 und 474), Insertion eines EcoRI/XhoI-Fragmentes in pGEX 4T3 (Mai 1999)
JT2	pRT104 NES	pRT104	NES of Lp-HsfA2	Insertion eines Linkers mit einer Asp718I- und einer XbaI-Schnittstelle, der die NES von HsfA2 enthält, in pRT104 unter Verwendung von Asp718I/XbaI (Okt. 1999)
JT3	pRTdS Luciferase (NES)	pRTdS-gfp	Luciferase (NES) (Luciferase (-) with C-terminal NES of HsfA2)	PCR-Amplifizierung von luciferase (-) in pRTdS Luciferase (-) (Primer 299 und 470); Insertion eines NcoI/Asp718I-Fragmentes in pRT104 NES ; Subklonierung in pRTdS-gfp unter Verwendung von XbaI/NcoI (Okt. 1999)
JT4	pJC20HNLp17.7A-CI	pJC20HN	LpHsp17.7A-CI	Subklonierung von LpHsp17.7-CI aus pGEXLpHsp17.7-CI in pJC20HN unter Verwendung von EcoRI and XhoI (Aug. 2001)
JT5	pRTLpHsp17.7A-CI-myc	pRT104 c-myc	LpHsp17.7A-CI	PCR-Amplifizierung von LpHsp17.7-CI aus pRTdS LpHsp17.7-CI (Primer 270 und 1199) und Ligation in pRT104 c-myc unter Verwendung von NcoI/NheI (Aug. 2002)
JT6	pRTdS c-Strep	pRTdS-gfp	Strep-tag	Insertion eines Linkers mit einer NcoI- und einer XbaI-Schnittstelle (Oligo 1373 und 1374), der eine Strep-Markierung enthält, in pRTdS gfp unter Verwendung von NcoI/XbaI (Feb. 2003)
JT7*	pRTdSLeHsp17.6-CI-Strep	pRTdS c-Strep	LeHsp17.6-CI	PCR-Amplifizierung von LeHsp17.6-CI aus pRT LeHsp17.6-CI (Primer 270 and 1399) und Ligation unter Verwendung von XhoI/NheI in pRTdS c-Strep (Feb. 2003)
JT8	pRTdSLpHsp17.7A-CI-Strep	pRTdS c-Strep	LpHsp17.7A-CI	Subklonierung von LpHsp17.7-CI aus pRT LpHsp17.7-CI c-myc in pRT dS c-Strep unter Verwendung von NcoI/NheI (Feb. 2003)
JT9*	pRTdSLeHsp17.6-CI	pRTdS-gfp	LeHsp17.6-CI	PCR-Amplifizierung von LeHsp17.6-CI from Le-cDNA (Primer 1209 und 1210) Insertion eines XhoI/XbaI-Fragmentes in pRT; Subklonierung in pRTdS-gfp unter Verwendung von XhoI/XbaI
JT10*	pRTdSLeHsp17.8-CI	pRTdS-gfp	LeHsp17.8-CI	PCR-Amplifizierung von LeHsp17.7-CI aus Le-cDNA (Primer 1209 und 1211) Insertion eines XhoI/XbaI fragment in pRT; Subklonierung in pRTdS-gfp unter Verwendung von XhoI/XbaI
JT11*	pRTdSLeHsp18.1-CI	pRTdS-gfp	LeHsp18.1-CI	PCR-Amplifizierung von LeHsp18.1-CI aus Le-cDNA (Primer 1209 und 1212) Insertion eines XhoI/XbaI-Fragmentes in pRT; Subklonierung in pRTdS-gfp unter Verwendung von XhoI/XbaI
JT12*	pRTdSLeHsp17.7-CI	pRTdS-gfp	LeHsp17.7-CI	PCR-Amplifizierung von LeHsp17.7-CI aus Le-cDNA (Primer 1209 und 1520) Insertion eines XhoI/XbaI-Fragmentes in pRTdS-gfp
JT13*	pRTdSLeHsp18.2-CI	pRTdS-gfp	LeHsp18.2-CI	PCR-Amplifizierung von LeHsp18.2-CI aus Le-cDNA (Primer 1518 und 1519) Insertion eines XhoI/XbaI-Fragmentes in pRTdS-gfp
JT14*	pRTdSLeHsp15.6-	pRTdS-gfp	LeHsp15.6-CI(r)	PCR-Amplifizierung von LeHsp15.6-CI aus Le-cDNA (Primer 1521 und 1522)

	CI			Insertion eines XhoI/XbaI-Fragmentes in pRTdS-gfp (Tripelligation)
JT15	pGEXLeHsp17.6-CI	pGEX 4T1	LeHsp17.6-CI	Insertion eines XhoI/XbaI-Fragmentes aus pRTdSLeHsp17.6-CI in pBSK+; Subklonierung in pGEX 4T1 unter Verwendung von XhoI/NotI (Aug. 2003)
JT16	pGEXLeHsp17.7-CI	pGEX 4T1	LeHsp17.7-CI	Insertion eines XhoI/XbaI-Fragmentes aus pRTdS LeHsp17.7-CI in pBSK+; Subklonierung in pGEX 4T1 unter Verwendung von XhoI/NotI (Aug. 2003)
JT17	pGEXLeHsp17.8-CI	pGEX 4T1	LeHsp17.8-CI	Insertion eines XhoI/XbaI-Fragmentes aus pRTdS LeHsp17.8-CI in pBSK+; Subklonierung in pGEX 4T1 unter Verwendung von XhoI/NotI (Aug. 2003)
JT18	pGEXLeHsp18.1-CI	pGEX 4T1	LeHsp18.1-CI	Insertion eines XhoI/XbaI-Fragmentes aus pRTdS LeHsp18.1-CI in pBSK+; Subklonierung in pGEX 4T1 unter Verwendung von XhoI/NotI (Aug. 2003)
JT19	pGEX LeHsp18.2-CI	pGEX 4T1	LeHsp18.2-CI	Insertion eines XhoI/XbaI-Fragmentes aus pRTdS LeHsp18.2-CI in pBSK+; Subklonierung in pGEX 4T1 unter Verwendung von XhoI/NotI (Aug. 2003)
JT20*	pRTdSAtHsp101	pRTdS-gfp	AtHsp101	Subklonierung in pRTdS-gfp aus pBSKAtHsp101 unter Verwendung von XhoI/XbaI
JT21*	pRTdSLeHsp15.6-CI-Strep	pRTdS c-Strep	LeHsp15.6-CI	PCR-Amplifizierung von LeHsp15.6-CI aus pRTdSLeHsp15.6-CI (Primer 270 und 1683) Insertion eines XhoI/NheI-Fragmentes in pRTdS c-Strep
JT22	pRTAtHsp17.4-CI-Strep	pRT101	AtHsp17.4-CI	AtHsp17.4-CI in pRT101 (E. Vierling)

At, *Arabidopsis thaliana*; Le, *Lycopersicon esculentum*, Lp, *Lycopersicon peruvianum*, Ps, *Pisum sativum*.\* Die gekennzeichneten, in pRTdS-gfp klonierten Konstrukte verfügen über einen doppelten 35S-Protomotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus (CaMV), jedoch nicht über einen *tobacco etch virus* (TEV)-enhancer.

**Tab. 8: Primer, die zur Klonierung der in Tab. 7 aufgeführten Konstrukte verwendet wurden.**

Plasmid	Template	Primer	Sequenz	Nr.*
pGEXPsHsp17.1-CII (JT1)	pRTPsHsp17.1-CII	F	CCACAAAGAATTCAATCGATTTCAGGC	474
		R	GCGGACTCGAGACACCGATCAAGC	473
pRT104NES (JT2)	-	Top strand	GTACCTTTACAAGACCTTGATAGTCAACTGGT TTCCTTTAGT	468
		Bottom strand	CTAGACTAAAGGAAACCAAGTTGATCTACAAGG TCTTGTAAG	469
pRTdS Luciferase (NES) (JT3)	pRTdS Luciferase (-)	F	GAAGGTCATTTTCATTTGGAGAGGAC	299
		R	CTCTAGAATGGTACCGCGATCTTCCGCC	470
pRTLpHsp17.7A-CI-myc (JT5)	pRTdSLpHsp17.7-CI	F	GACGCACAATCCCACTATCC	270
		R	CCGAAGCTAGCACCAGAGATTTCAATAGAC	1199
pRTdS c-Strep (JT6)	-	Top strand	CATGGACACCGGCTAGCTGGAGCCACCCGCAG TTCGAAAAATAAT	1373
		Bottom strand	CTAGATTATTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAG CTAGCCGGT	1374
pRTdSLeHsp17.6-CI-Strep (JT7)	pRTLeHsp17.6-CI	F	GACGCACAATCCCACTATCC	270
		R	CACATGCTAGCACCAGAGATCTCAATG	1399
pRTdSLeHsp17.6-CI (JT9)	TC162620	F	CTCAAAAAGTCTCGAGAAAATGTCTCTGATCCC AAG	1209
		R	GATTTCTAGACTTTAATACAGAAACAGAACG	1210
pRTdSLeHsp17.8-CI (JT10)	TC98618	F	CTCAAAAAGTCTCGAGAAAATGTCTCTGATCCC AAG	1209
		R	GATATCTAGAACTAGTAAAACGACTCAGCG	1211
pRTdSLeHsp18.1-CI (JT11)	TC155466	F	CTCAAAAAGTCTCGAGAAAATGTCTCTGATCCC AAG	1209
		R	TTAAATCTAGATCTTAATCTCCAACAAACC	1212
pRTdSLeHsp17.7-CI (JT12)	TC163795	F	CTCAAAAAGTCTCGAGAAAATGTCTCTGATCCC AAG	1209
		R	AGCAACTCTAGACCTTCAACA	1520
pRTdSLeHsp18.2-CI (JT13)	TC164285	F	TCTTCCTCGAGCAAATGTCTCTTATTCC	1518
		R	GACATTTCTAGAGTCACAAAATTCAG	1519
pRTdSLeHsp15.6-CI (JT14)	EST586873	F	GGAAACTCGAGATGTGCAGCTTATTG	1521
		R	CGATTCTAGATTCAATCGAATTGC	1522
pRTdSLeHsp15.6-CI-Strep (JT21)	pRTdSLeHsp15.6-CI	F	GACGCACAATCCCACTATCC	270
		R	TAAAGTTCAGCTAGCTTTTCTTCAATTTC	1683

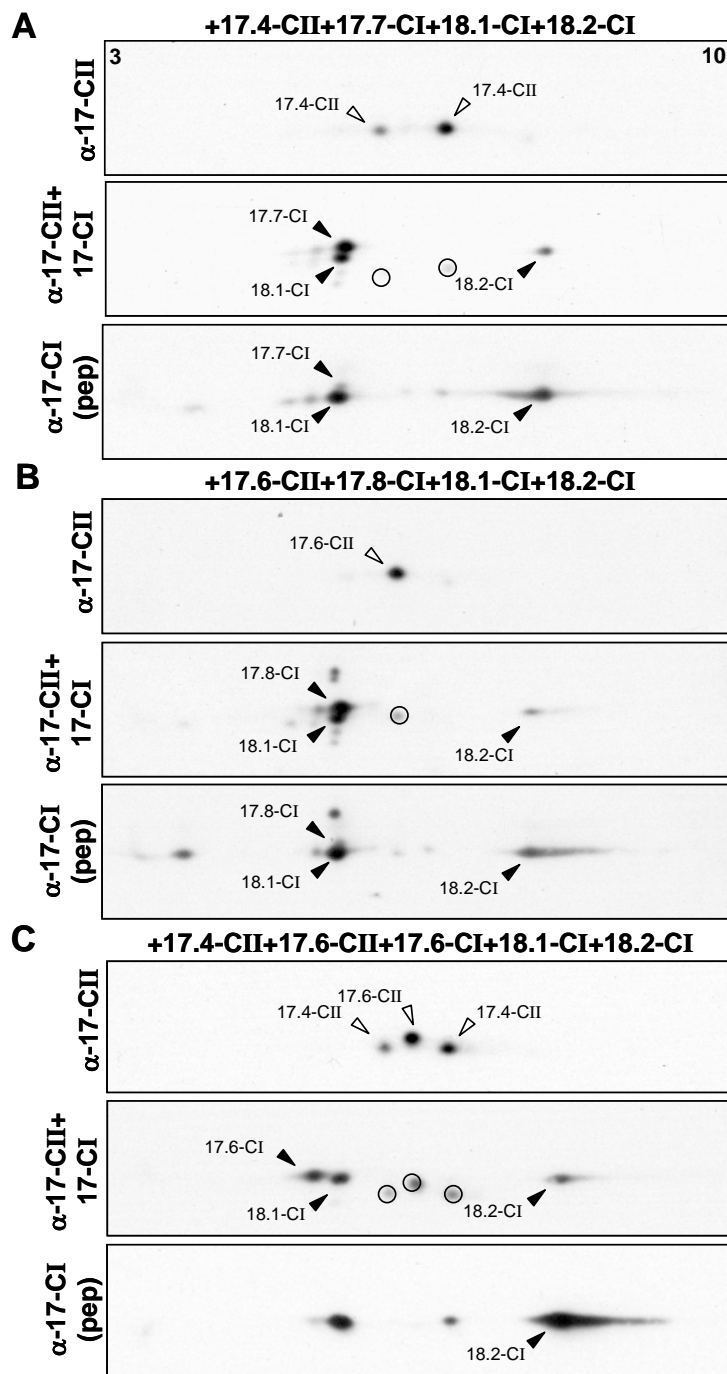
EST, *expressed sequence tag*; TC, *tentative consensus sequence*; Le, *Lycopersicon esculentum*; Lp, *Lycopersicon peruvianum*; Ps, *Pisum sativum*; F, *forward*; R, *reverse*.

\*Zusätzliche Informationen sind in der Primersammlung der Arbeitsgruppe verfügbar.

Tab. 9: Primer, die für die RT-PCR-Analyse in Abb. 8 verwendet wurden.

Template/ Plasmid	Primer	Sequenz	Nr.*
Hsp70-1 (TC155261 )	F	GCCTACAACATGAGGTACCCTATAAAGGATG	1354
	R	CAACACCAATCTAGAAACAAGAGCC	1357
Hsp70-2 (TC154318 )	F	GCCTACAACATGAGGTACCCTATAAAGGATG	1354
	R	CTTTCCTCTAGAAGCTGT TCTC	1358
Hsp70-3 (TC156156 )	F	GCCTACAACATGAGGTACCCTATAAAGGATG	1354
	R	CAACATTCTAGATTGTATTTCAATTGAAG	1359
Hsp70-4 (TC154204 )	F	GCCTACAACATGAGGTACCCTATAAAGGATG	1354
	R	GGCATATCTA GATCAAACGGTACAGC	1360
Hsp70-5 (TC164785 )	F	AGATATAGAAGTAATCTAGTACAT	1847
	R	GTAAAGAATCTAGACAAAGATATAGAAG	1362
Hsp70-6 (TC155792 )	F	ACTGCACCACTGTTTTAGTAGA	1846
	R	AGTAACTCTAGAAGCTTTTTAGTAG	1361
Hsp17.4-CII (TC157710 )	F	CACGATAGAACCATGGATTTGAGGTTG	1127
	R	GTAATCTAGAGCAGCAATTGC	1128
Hsp17.6-CII (TC163406 )	F	CCAAAAATTTCTCGAGACTGAAAATGGATTTGAGGTTG	1129
	R	CCATCTAGACAGAGTCCATAACTTCAAGC	1130
Hsp17.6-CI (TC162620 )	F	CTCAAAAAGTCTCGAGAAAATGTCTCTGATCCCAAG	1209
	R	GATTTCTAGACTTTAATACAGAAACAGAACG	1210
Hsp18.1-CI (TC155466)	F	CAACGATCCATCCTCTGCTCG	1367
	R	TTAAAATCTAGATCTTAATCTCCAACAAACC	1212
Hsp101	F	GGCAAGTGATCATGGAGAAGG	955
	R	CCAGTAGCAGCATTCACAAGCC	956
Aktin	F	ACCTTCAATGATTGGAATGG	684
	R	CCTTTGCAATCCACATCTGC	685

\*Zusätzliche Informationen sind in der Primersammlung der Arbeitsgruppe verfügbar.



**Abb. 25: Identifizierung der Position von sHsp der Klassen CI und CII mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese.**

(A, B, C) Um die in der Abbildung angegebenen Vertreter der Klasse CI und CII aus *Lycopersicon esculentum* identifizieren zu können (siehe Abb. 9) wurden Protoplasten aus CS-Pflanzen mit den entsprechenden Expressionsvektoren transformiert. Nach Inkubation über Nacht bei 25°C wurden die Proben geerntet und Proteinextrakte hergestellt, die mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese und anschließender Immunoblot-Analyse untersucht wurden. Der Verlauf des pH-Gradients ist am oberen Rand, die verwendeten Antiseren sind am linken Rand angegeben. Die Positionen von Vertretern der Klasse CI sind mit geschlossenen Pfeilen, die Positionen von Vertretern der Klasse CII mit offenen Pfeilen markiert.



# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen danken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben:

Lutz Nover und Klaus-Dieter Scharf für die engagierte Betreuung dieser Arbeit, ihre Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Den jetzigen und ehemaligen Mitgliedern des Labors 323 (und natürlich auch des Labors 324), insbesondere Markus Fauth, Christian Weber, Sybille Winkelhaus und Masood Siddique, deren Humor und Hilfsbereitschaft für eine angenehme Arbeitsatmosphäre gesorgt haben und mich einige Tiefpunkte überwinden ließen.

Shravan Kumar Mishra für die sehr gute Zusammenarbeit, die meine Arbeit ein entscheidendes Stück weitergebracht hat, und für viele inspirierende Gespräche.

Angelika Tintschl-Körbitzer, Ute Biskamp und Daniela Bublak, die mich tatkräftig bei der Arbeit im Labor unterstützt haben.

Allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Molekulare Zellbiologie“.

Besonderer Dank gebührt meinen Eltern und meiner Schwester, die mir stets emotionalen Beistand gewährt und mich unterstützt haben.

# Lebenslauf

**Name:** Joanna Tripp  
**Wohnort:** Ginnheimer Landstraße 204  
60431 Frankfurt  
**Geburtsdatum:** 20.10.1975  
**Geburtsort:** Frankfurt am Main

## Schulbildung

1981-1985 Elsa-Brandström-Schule (Grundschule) in Frankfurt am Main  
1985 Bettina-Gymnasium in Frankfurt am Main  
1985-1991 Bertha-von-Suttner-Gesamtschule in Nidderau  
1991-1994 Lichtenberg-Oberstufengymnasium in Bruchköbel  
1994 Erlangen der allgemeinen Hochschulreife

## Studium

1994-1996 Grundstudium im Fach Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main  
1996 Diplomvorprüfung  
1996-1999 Hauptstudium im Fach Biologie  
Januar 1999 Diplomprüfung in Botanik (Hauptfach), Mikrobiologie (1. Nebenfach) und Pharmazeutische Biologie (2. Nebenfach)  
Februar 1999-2000 Diplomarbeit am Botanischen Institut, Lehrstuhl für Molekulare Zellbiologie bei Herrn Prof. Dr. Lutz Nover, Titel: „Untersuchung der *in vivo*-Chaperonfunktion von Proteinen der Hsp20-Familie und ihrer Interaktion mit Luciferase“  
März 2000 Erlangen des Diploms für Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität

## Promotion

Juli 2000 bis heute: Promotion am o.g. Lehrstuhl von Herrn Prof. Dr. Lutz Nover, Titel: „Funktionsanalyse von Hitzestressproteinen aus *Lycopersicon esculentum*“.

Frankfurt am Main, im Februar 2005

## **Publikationen:**

**Mishra S.K., Tripp J., Winkelhaus S., Tschiersch B., Theres K., Nover L., Scharf K.D.** (2002). In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. *Genes Dev.* **12**: 1555-67.

**Siddique M., Port M., Tripp J., Weber C., Zielinski D., Calligaris R., Winkelhaus S., Scharf K.D.** (2003). Tomato heat stress protein Hsp16.1-CIII represents a member of a new class of nucleocytoplasmic small heat stress proteins in plants. *Cell Stress Chaperones* **8**: 381-94.

**Port M., Tripp J., Zielinski D., Weber C., Heerklotz D., Winkelhaus S., Bublak D., Scharf K.D.** (2004). Role of Hsp17.4-CII as Coregulator and Cytoplasmic Retention Factor of Tomato Heat Stress Transcription Factor HsfA2. *Plant Physiol.* **135**: 1457-70.

**Baniwal S.K., Bharti K., Chan K.Y., Fauth M., Ganguli A., Kotak S., Mishra S.K., Nover L., Port M., Scharf K.-D., Tripp J., Zielinski D. and von Koskull-Döring P.** (2004) Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than 20 heat stress transcription factors. *J Biosci* **29**: 471–487 (Review).

**Miroshnichenko S., Tripp J., zur Nieden U., Neumann D., Conrad U., Manteuffel, R.** (2005). Immunomodulation of function of small heat shock proteins prevents their assembly into heat stress granules and results in cell death at sublethal temperatures. *Plant J.* **41**: 269-281.

